

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année scolaire 1961-1962 Thèse n° 46

Enquête sur la présence d'antibiotiques dans le lait dans trois zones de production

THÈSE

présentée à la

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

et soutenue publiquement le 26 juin 1962

pour obtenir le grade de docteur vétérinaire

par

Pierre MOREL

Né le 1^{er} avril 1937, à Lunéville (Mthe-et-Mlle)



Imprimerie "Au Manuscrit"
10, Rue Paul-Bert ALFORT (Seine)

1962

Enquête sur la présence
d'antibiotiques dans le lait
dans trois zones de production

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année scolaire 1961-1962 Thèse n°

Enquête sur la présence d'antibiotiques dans le lait dans trois zones de production

THÈSE

présentée à la

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

et soutenue publiquement le 26 juin 1962

pour obtenir le grade de docteur vétérinaire

par

Pierre MOREL

Né le 1^{er} avril 1937, à Lunéville (Mthe-et-Mlle)



Imprimerie " Au Manuscrit "
10, Rue Paul-Bert ALFORT (Seine)

1962

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur : FLORIO
Directeur Honoraire : JUNG
Professeur honoraire : CUNY

Professeurs

	MM.
Physique et Chimie biologiques Pharmacie, Toxicologie, Hygiène et Inspection du lait	TAPERNOUX
Anatomie descriptive, Anatomie appliquée.....	BARONE
Physiologie, Pharmacodynamie, Thérapeutique, Matière médicale	BOST
Histologie, Embryologie, Tératologie, Anatomie pathologique..	LUCAM
Hygiène et industrie des aliments d'origine animale	FLACHAT
Zoologie appliquée, Parasitologie	EUZEBY
Technique chirurgicale, Pathologie chirurgicale.....	COLLET
Pathologie médicale des équidés et des carnivores. Législation vétérinaire	FLORIO
Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour ..	COTTEREAU
Pathologie de la reproduction, Obstétrique.....	BERTRAND
Immunologie et Microbiologie, Maladies légalement contagieuses et Police sanitaire	JOUBERT
Agronomie, Botanique appliquée, Alimentation	JEAN-BLAIN
Ethnologie, Hygiène, Economie rurale, Zootechnie.....	FROGET

Chefs de Travaux

MM. MAGAT, FERNEY, RUCKEBUCH, *Agrégés*,
MM. BUSSIERAS, OUDAR, PAVOT, VAN HAVERBEKE.

Examineurs de Thèse

Président : M. le Professeur BERTOYE
Premier Assesseur : M. le Professeur BERTRAND
Deuxième Assesseur : M. le Professeur FLORIO

La Faculté de Médecine et l'Ecole Nationale Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.

A TOUTE MA FAMILLE

A CEUX QUE J'AIME

A M. le Professeur BERTOYE

Professeur à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

Médecin des Hôpitaux.

Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon.

*Qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de notre
jury de thèse.*

A M. le Professeur BERTRAND
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

*Pour ses encouragements tout
au long de l'élaboration de ce
travail.*

A M. le Professeur FLORIO
Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

*En reconnaissance de la bienveil-
lance qu'il nous a toujours témoi-
gnée.*

A M. G. Mocquot,
Directeur de la Station Centrale de Microbiologie
et Recherches Laitières à Jouy-en-Josas,

et

A M. le Docteur Vétérinaire M. PLOMMET,
Chargé de Recherches
du Centre National de Recherches Zootechniques.

*Qui nous ont inspiré ce travail
et nous ont guidé de leurs con-
seils: qu'ils trouvent ici la marque
de notre gratitude.*

A tous nos Maîtres de l'Ecole de Lyon.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553211_0013

INTRODUCTION

La thérapeutique vétérinaire des mammites fait, presque exclusivement, appel aux antibiotiques par voie intramammaire. Les résultats spectaculaires de cette thérapeutique font que les quantités d'antibiotiques employées sont de plus en plus importantes.

Or, une partie de ces médicaments est éliminée dans le lait et, dès lors, ils peuvent créer des problèmes d'industrie laitière et parfois de santé publique.

L'apparition de ces problèmes a incité à mener des enquêtes pour déterminer la fréquence et le degré de contamination du lait par les antibiotiques : ce fut le cas, en particulier, aux Etats-Unis, en Grande-Bretagne, en Australie, au Canada.

En France, semblables enquêtes n'avaient pas été entreprises et celle qu'il nous fut demandé de faire devait s'inspirer des enquêtes étrangères et ses résultats devaient être interprétés, comparés à celles-ci.

Nous avons désiré rassembler dans ce travail tout ce qui était relatif aux quantités d'antibiotiques que nous risquions de rencontrer au cours de notre enquête :

— D'une part pour montrer l'importance que peuvent avoir ces quantités sur le plan de l'industrie laitière et sur le plan de l'hygiène :

— D'autre part pour connaître les limites d'application des méthodes proposées pour la détection des antibiotiques dans le lait et pour faire choix d'une méthode adaptée aux conditions matérielles de notre enquête.

*
**

Le plan que nous suivrons sera le suivant :

GÉNÉRALITÉS

Première partie

LES PROBLÈMES SUSCITÉS PAR LA PRÉSENCE D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

- a) Problèmes de Santé Publique ;
- b) Problèmes d'Industrie Laitière ;
- c) Quantités d'antibiotiques dans le lait après traitement ;
- d) Conclusion de la première partie.

Deuxième partie

LES MÉTHODES DE DÉTECTION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

- a) Tests fondés sur les modifications de morphologie des levains lactiques ;
- b) Tests fondés sur les modifications de métabolisme de micro-organismes mis en présence d'antibiotiques ;
- c) Tests fondés sur la diffusion en gélose des antibiotiques.

Troisième partie

L'ENQUÊTE PROPREMENT DITE

- a) Méthode employée ;
- b) Résultats ;
- c) Discussion des résultats.

CONCLUSIONS

GENERALITES

Un lait contenant des antibiotiques est d'apparence et d'odeur normales, mais ses propriétés biologiques sont modifiées.

La détection des antibiotiques dans le lait ne peut être immédiate ; les techniques de dosage chimique sont impossibles parce qu'elles ne sont pas assez sensibles et parce que d'autres substances que les antibiotiques réagissent aussi.

Il reste qu'il faut apprécier l'activité biologique des laits contaminés. Les solutions à envisager sont conditionnées par les différents buts poursuivis.

A la laiterie les facteurs : « facilité de la mise en œuvre du test et précocité du résultat », sont les plus importants ; pour les hygiénistes c'est l'aspect : « grande sensibilité des méthodes ».

En effet, le temps imparti aux recherches du laboratoire dans l'industrie laitière est de quelques minutes et l'obligation d'avoir un résultat dans ce temps est indispensable si l'on veut prévenir les accidents au cours de la fabrication en écartant les laits contaminés dès la réception des bidons à la laiterie.

Si, pour des hygiénistes, l'importance de la rapidité est moindre, c'est une recherche quantitative non moins facile qu'ils doivent mettre en œuvre car les quantités présentes sont infimes, de l'ordre de 0,000.000.1 g de pénicilline par millilitre de lait. Cet aspect implique un contrôle rigoureux de tous les facteurs qui interviennent pour modifier la sensibilité des tests de détection.

Pour notre enquête le facteur rapidité importait peu.

Mais il nous fallait choisir une méthode simple et commode à utiliser si nous voulions réaliser un maximum d'examens et n'employer qu'un minimum de matériel dans nos déplacements. Notre méthode devait être suffisamment sensible pour déceler tous les échantillons qui auraient pu affecter la fabrication du fromage. Elle devait

être fidèle si nous voulions nous référer à une courbe étalon établie auparavant, ce qui nous permettrait de faire une évaluation quantitative des antibiotiques rencontrés.

Mais à côté des caractères que nous venons d'indiquer et qui sont propres aux différents buts poursuivis dans la détection des antibiotiques du lait, il est un autre aspect, légal celui-ci. Cet autre point de vue fait appel à des mesures d'éducation, de contrôle, de surveillance et même de coercition.

Car en effet l'addition de substances étrangères au lait est prohibée, si l'on se reporte à l'article 4 du décret du 22 janvier 1919 et ainsi conçu :

« Est considéré comme une falsification aux termes de l'article 3 de la loi du 1^{er} août 1905 :

... l'addition au lait d'une substance quelconque, exception faite pour celles dont l'emploi pourrait être autorisé, en vue de la conservation du lait, par arrêté pris de concert par le Ministre de l'Hygiène et de l'Agriculture, après avis du Conseil Supérieur d'Hygiène publique de France. »

PREMIERE PARTIE

LES PROBLEMES SUSCITES PAR LA PRESENCE D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

A. -- PROBLEMES DE SANTE PUBLIQUE

Deux problèmes de Santé Publique se sont posés, résultant de l'ingestion de lait ou de produits laitiers contenant des antibiotiques.

Ces problèmes sont d'inégale importance ; ce sont :

- 1° La sensibilisation de l'homme aux antibiotiques ;
- 2° L'acquisition par des souches microbiennes d'une résistance à l'action des antibiotiques.

1° Sensibilisation de l'homme aux antibiotiques.

Il est d'observation courante, en clinique médicale, de voir apparaître des phénomènes de sensibilisation après un traitement par certains antibiotiques. Ces manifestations apparaissent soit immédiatement après l'administration de ces antibiotiques, soit tardivement et elles prennent, le plus souvent, l'allure d'urticaire.

Les différents antibiotiques possèdent cette propriété à des degrés divers.

La streptomycine par voie orale, les tétracyclines, la néomycine, la bacitracine, la polymyxine B sont de faibles agents de sensibili-

sation (76) encore que BORRIE rapporte le cas de réactions de photosensibilisation avec l'une des plus récentes tétracyclines (14).

La pénicilline, par contre, est un agent majeur de sensibilisation. On a cité le cas d'un patient qui tombait en collapsus lorsqu'une dose de 3.1.000.000 d'unité de pénicilline lui était injectée par voie sous-cutanée. Cependant, la majorité des observations a été faite après l'administration de doses de l'ordre de 100.000 unités ou plus par intervention.

Or, les doses apportées par le lait sont très inférieures. De plus elles sont reçues par voie orale et l'on sait que la pénicilline G est largement détruite par l'acidité gastrique. Quelle est donc l'incidence de ces doses minimes sur les phénomènes de sensibilisation ? En Grande-Bretagne (14-15), trois cas ont été décrits de patients dont les réactions de dermatite sont apparues après ingestion de lait. Mais ces patients étaient exceptionnellement sensibles à la pénicilline d'une part, et, d'autre part la sensibilisation primaire avait été provoquée chez eux par une dose thérapeutique.

Des réactions après ingestion de lait contenant de la pénicilline ont dont été décrites et nombre de réactions allergiques n'ont sans doute pas été rapportées à cette cause.

Mais il n'a jamais été prouvé la sensibilisation primaire par ingestion de lait. Il y a le cas d'individus qui n'ont apparemment jamais reçu de pénicilline et qui réagissent à la première injection thérapeutique. Il a été suggéré que ces individus étaient déjà sensibilisés par l'ingestion de lait contenant de la pénicilline, mais cela n'a jamais été démontré.

WELCH communiqua les résultats de l'enquête menée par le "Food and Drug Administration" (U.S.A.) en 1955, à trente et une personnalités médicales (spécialistes de la thérapeutique antibiotique et de l'allergie, pédiatres).

Ces résultats étaient les suivants : sur 474 échantillons de lait 11,6 % contenaient de la pénicilline dont les doses variaient entre 0,003 et 0,55 unités par ml de lait, la moyenne étant de 0,015 unités (77).

Il ressort de l'avis des personnalités consultées qu'à ces doses il est peu vraisemblable que la pénicilline puisse induire des sensibilisations. Ces faibles quantités ne pourraient que susciter une réaction déchaînée chez un patient particulièrement sensible à la pénicilline et déjà sensibilisé par une injection thérapeutique.

Ces individus exceptionnellement sensibles ne représenteraient que 10 % de la population (45), 5 % pour CRIEP (20), 1 à 5 % pour BORRIE (14).

De plus la profession médicale est bien armée en face de ces

réactions grâce à l'enzyme antagoniste de la pénicilline, la pénicillinase. Une étude sur quatre patients qui présentaient des réactions urticariennes après ingestion de produits laitiers contenant de la pénicilline, montra qu'une injection de 800.000 unités de pénicillinase fait disparaître cette crise allergique en 12 à 96 heures et ce pendant quatre à sept jours (83).

Il est donc à peu près certain que les petites doses de pénicilline que l'on rencontre dans le lait et les produits laitiers soient intervenues dans des phénomènes allergiques ; non pas, semble-t-il, pour induire la sensibilisation mais pour provoquer une réaction déchaînée chez une personne déjà sensibilisée à ce produit par une première administration plus forte et sans doute d'ordre thérapeutique.

2° Acquisition, par des souches microbiennes, d'une résistance à l'action des antibiotiques.

C'est un phénomène général que celui de bactéries qui deviennent antibiorésistances et, dès lors, sont insensibles aux antibiotiques.

La thérapeutique antibiotique détruit un grand nombre de bactéries pathogènes mais parmi celles-ci il en est de naturellement résistantes et d'autres qui le deviennent sous l'effet de mutations : ce sont des mutants résistants. Ces souches résistantes prolifèrent à mesure que les souches sensibles sont détruites.

Ceci est particulièrement vrai pour les staphylocoques dont certaines souches sécrètent une pénicillinase. Plus la pénicilline exerce son action sur une population, plus la proportion de souches sécrétant une pénicillinase augmente. Ceci s'est vérifié en milieu hospitalier et dans le domaine vétérinaire du traitement des mammites ; ce phénomène a changé en quelques années la physionomie de celles-ci. Lorsque la pénicilline fit son entrée dans l'arsenal thérapeutique des mammites, vers 1944, seulement 2 % des souches de staphylocoques lui étaient résistantes : à présent c'est plus de 70 % des souches qui présentent cette résistance (79).

Certains auteurs ont suggéré que l'ingestion par l'homme des petites quantités d'antibiotiques dans les aliments pouvaient favoriser le développement de micro-organismes résistant (19-22-75) et au moins opérer une sélection dans la flore intestinale.

Les personnalités médicales consultées par WELCH (76) pensent qu'il est peu probable qu'aux concentrations où l'on trouve les antibiotiques dans le lait, ceux-ci puissent favoriser la prolifération des souches résistantes.

Néanmoins ce problème constitue un danger potentiel et il mérite l'attention des Services de Santé Publique.

B. — PROBLEMES D'INDUSTRIE LAITIERE

L'action des antibiotiques sur les micro-organismes est un phénomène général. Les levains lactiques utilisés pour la fabrication de produits laitiers (streptocoques lactiques et lactobacilles) sont particulièrement sensibles à l'action inhibitrice des antibiotiques et ceci revêt une importance capitale dans l'industrie laitière.

1° Inhibition des levains lactiques.

Nous allons citer les concentrations qui interviennent pour modifier le développement de ces ferments lactiques.

KOSIKOWSKI et MOCQUOT (53) ont rassemblé dans un tableau les quantités de pénicilline qui provoquent une inhibition significative de la croissance de différentes souches de streptocoques lactiques et de lactobacilles. Les lactobacilles sont, d'une manière générale, plus résistants à la pénicilline que les streptocoques lactiques. Le plus sensible des lactobacilles est *Lactobacillus bulgaricus* pour qui la dose inhibitrice est 0.30 à 0.60 unités de pénicilline par millilitre de lait. Parmi les streptocoques, *Streptococcus thermophilus* est le plus sensible et son développement est inhibé avec 0.01 à 0.05 unité de pénicilline par millilitre de lait (61). *Streptococcus lactis* est inhibé avec 0.10 à 0.30 unités de pénicilline, par millilitre de lait.

HIBBS et BOYD (32) ont donné pour *Str. lactis* les doses suivantes d'antibiotiques ayant la même activité inhibitrice que 0,1 et 0,2 unité de pénicilline par millilitre de lait :

Pénicilline	0,1 U.I./ml lait	0,2 U.I./ml lait
Auréomycine	0,1 γ /ml lait	0,2 γ /ml lait
Dihydro streptomycine...	0,8 γ /ml lait	1,6 γ /ml lait
Terramycine	0,2 γ /ml lait	0,4 γ /ml lait
Néomycine	2,0 γ /ml lait	4,0 γ /ml lait

Les levains lactiques du commerce sont composés de plusieurs souches. Ils sont, en général, partiellement inhibés avec des concentrations de l'ordre de 0.1 unité de pénicilline par millilitre de lait. BRADFIELD (16) a donné le chiffre de 0,25 γ d'auréomycine par millilitre de lait comme concentration en dessous de laquelle un levain commercial n'est pas inhibé. OVERBY (62) constatait, en 1952, que la plus petite dose qui puisse amener un retard sensible de

développement d'un levain commercial danois après neuf heures d'incubation, était :

- 0,01 γ par millilitre de lait, avec la terramycine ;
- 0,02 γ par millilitre, avec l'auréomycine ;
- de 0,02 à 0,04 γ par millilitre avec la streptomycine ;
- et de 0,10 à 0,20 γ par millilitre avec la chloromycétine.

Ce même levain était complètement inhibé, après neuf heures d'incubation toujours, avec :

- 1,0 γ d'auréomycine, 2,0 γ de terramycine ;
- 10,0 γ de streptomycine ou de chloromycétine.

KATZNELSON et HOOD (44) ont dressé, par ordre d'efficacité décroissante sur les levains lactiques, la liste suivante des antibiotiques : pénicilline, subtiline, streptomycine, auréomycine, bacitracine et chloromycétine.

2° Accidents de fabrication dans l'industrie laitière.

L'inhibition totale du développement de la flore lactique ou même seulement l'inhibition partielle, provoque des accidents en laiterie, accidents qui peuvent rendre les produits de fabrication impropre à la commercialisation. Grave aussi pour les industriels laitiers, est la perte de temps occasionnée par les retards d'acidification. Ces retards obligent l'immobilisation des ustensiles et amènent des perturbations dans le plan de travail pendant une durée indéterminée.

Le phénomène accidentel est le même pour tous les produits laitiers : l'inhibition plus ou moins complète des levains lactiques se traduit par une prolifération anormale de colibacilles, germes gazogènes. Cette prolifération aurait dû normalement être freinée par la fermentation lactique. Il résulte de ceci une acidification faible et un égouttage très incomplet.

Les conséquences de ce phénomène diffèrent avec les produits laitiers en cause :

Avec les fromages tels que les camemberts l'égouttage du caillé n'a pas lieu et de plus les fromages gonflent sous l'action des gaz dégagés par les colibacilles.

Avec les fromages dont l'égouttage est physique comme c'est le cas pour le fromage de gruyère, les accidents se manifestent lors de la maturation et toujours par un gonflement anormal.

D'une façon générale tous les fromages sont de mauvaise consistance et d'un goût défectueux.

En beurrerie, les répercussions de la présence des antibiotiques

dans le lait sont moins graves et le beurre est consommable. Seul son arôme est modifié.

Pour provoquer l'arrêt de la maturation de la crème il faut, en effet, des doses considérables d'antibiotiques.

Il en va tout autrement pour les fromages et JACQUET (36) a montré qu'à partir de 0,15 U.I./ml des accidents se produisent dans la fabrication du Camembert. La gravité de ces accidents est fonction de la concentration du lait en antibiotique.

Les accidents qui surviennent dans la fabrication du fromage de Gruyère ont lieu avec des doses plus petites encore : MOCQUOT (61) montre que 0,02 U.I./ml est déjà une concentration critique et que 0,05 U.I./ml inhibe complètement la souche de *Lactobacillus thermophilus* qui servait à préparer le levain pour la fabrication du fromage.

Les accidents, survenant lors de la fabrication du fromage, du fait de l'action des antibiotiques sur les levains lactiques, sont graves.

Ils atteignent le produit lui-même qui ne peut alors être commercialisé. Ils atteignent aussi la bonne marche de l'usine, car l'industriel laitier ne peut estimer la durée des retards ainsi apportés à sa fabrication.

La question se pose maintenant de savoir si les quantités d'antibiotiques que l'on peut normalement trouver dans le lait livré aux laiteries, s'y trouvent à des concentrations critiques pour la fabrication de produits laitiers .

C. — QUANTITES D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT APRES TRAITEMENT

Après une injection intramammaire d'antibiotique, une partie est retenue, la partie non retenue passe dans le lait en quantité variable.

Les quantités d'antibiotiques que l'on est susceptible de trouver dans le lait sont différentes selon que l'on examine des laits individuels ou de mélange. Dans le premier cas, la quantité d'antibiotique dépend essentiellement du traitement qui a été institué, mais aussi de l'individu traité. Dans le second cas la quantité d'antibiotique dépend surtout de l'importance de la dilution du lait de la vache traitée.

Examiner des laits individuels ou de mélange répond à des

préoccupations différentes : dans le premier cas il s'agit de l'étude d'un traitement en particulier.

Dans le cadre de notre enquête il s'agissait de déterminer si un lait destiné à l'industrie laitière est dangereux par les quantités d'antibiotiques qu'il contient ; c'est donc sur des laits de mélange qu'ont été faits nos prélèvements.

Mais c'est de l'étude des laits individuels que nous pouvions déduire les doses probables présentes dans un lait de mélange et, ainsi, nous devions exiger de notre méthode des limites de sensibilité bien définies.

Cas des laits individuels

Le fait qui frappe est la disparité des chiffres cités par les chercheurs qui se sont penchés sur la question. ceci révèle que plusieurs facteurs influent sur le taux d'excrétion des antibiotiques.

ALBRIGHT (1) a rassemblé, dans une revue récente (1961), une abondante littérature consacrée à ce problème. de même que MARTH et ELLICKSON, en 1959 (60).

Il en ressort que les principaux facteurs responsables des variations observées relèvent de l'individu lui-même d'une part et du traitement d'autre part.

LES CARACTÉRISTIQUES INDIVIDUELLES ET L'ÉTAT SANITAIRE DE LA VACHE ET DE LA MAMELLE.

Quelle que soit la quantité d'antibiotique introduite dans la mamelle, le pourcentage d'élimination est, d'une façon générale, plus grand dès les premières traites. Mais ce pourcentage varie d'une vache à l'autre, d'un troupeau à l'autre.

OVERBY (63) rapporte que dans deux laits de mélange il avait été retrouvé respectivement 2.7 à 15,7 % et 72 à 84 % de la quantité de pénicilline injectée. L'administration du médicament avait été réalisée dans les mêmes conditions chaque fois. Mais d'autres auteurs ont donné des chiffres plus homogènes ; en particulier. HOVMAND (35) qui, dans le lait de deux troupeaux, a trouvé respectivement 37,4 % et 21,4 % à la première traite, de la pénicilline administrée. Mais cet auteur cite à l'intérieur d'un même troupeau une vache qui excréta 2.7 % tandis qu'une autre excréta 84 % de la quantité de pénicilline injectée dans la mamelle. Ces grands écarts sont explicables car l'état physiopathologique de la mamelle intervient pour

modifier les quantités d'antibiotiques excrétées. Une faible production de lait correspond, pour les vaches traitées, à une forte quantité d'antibiotique dans le lait, ceci est perceptible dès la moitié de la lactation. Une mamelle saine retient moins d'antibiotique qu'une mamelle enflammée. RUSOFF (68), après avoir injecté 426 mg d'auréomycine, constate que le lait de la mamelle saine contient deux à trois fois plus d'antibiotique que celui atteint de mammite.

Pour une même vache, le pourcentage d'élimination peut varier d'un moment à l'autre de la traite et il a été suggéré que la disparité des résultats pouvait être due à des prélèvements effectués en début, au milieu ou en fin de traite.

LE TRAITEMENT INSTITUÉ.

La quantité d'antibiotique qui s'élimine dans le lait au cours des différentes traites est variable avec le traitement. La quantité totale que l'on retrouve dans le lait varie avec la nature de l'antibiotique utilisé : 26 à 49 % de la pénicilline sont éliminés, 39 à 58 % de la streptomycine (28). Le temps pendant lequel le lait est contaminé dépend aussi de la nature de l'antibiotique, des quantités injectées et surtout de la nature de l'adjuvant associé à l'antibiotique dans la préparation pharmaceutique.

Des données générales ont été établies grâce à l'étude de la pénicilline :

Avec 25 000 U.I. sans substance retard ; à la première traite, on décèle de fortes doses (5 U.I./ml) ; à la seconde traite, des doses plus faibles (0,2 U.I./ml) et rien du tout à la troisième traite.

Avec 25.000 U.I. avec substance retard ; à la première et à la seconde traite, on décèle 3 U.I./ml ; à la troisième traite de 0,1 à 1 U.I./ml et rien du tout à partir de la sixième traite (53).

Avec 100 000 U.I. de pénicilline en solution aqueuse ALBRICHT (2) décèle 0,5 U.I. et plus par millilitre dans le lait de la troisième traite (36 h. après l'injection), à la quatrième traite (48 h. après l'injection), le lait de trois vaches sur huit est encore contaminé. Dans le lait de la première traite la concentration est de l'ordre de 8 à 10 U.I./ml. Avec 100.000 U.I. de pénicilline en solution huileuse il décèle 0,5 U.I. et plus par ml dans le lait de la sixième traite (72 h. après l'injection), le lait de quatre vaches sur huit est encore contaminé.

Lorsqu'on utilise 200.000 U.I. et quel que soit l'excipient associé, la quantité éliminée au cours des deux premières traites est supérieure à 10 U.I./ml (67).

Il ressort de la comparaison de ces données que plus la dose thérapeutique est élevée, plus le temps d'élimination est long.

Olga UVAROV l'a confirmé, mais ce qui est vrai pour la pénicilline ne l'est pas pour la streptomycine: elle montre que 250 mg ou 500 mg sont éliminés dans le même temps que 100 mg; le plus fort dosage entraînant une concentration plus forte dans le lait (73). Des différents antibiotiques c'est l'auréomycine qui semble persister le plus longtemps dans le lait: RUSOFF (68), après l'injection de 426 mg d'auréomycine en solution huileuse, la décèle pendant six jours.

La comparaison des chiffres cités montre aussi que le type de préparation exerce une influence sur la durée d'élimination, donc sur la rétention de l'antibiotique dans la mamelle.

En clinique vétérinaire il est apparu que ce n'est pas tant l'importance de la dose que le temps de présence dans la mamelle qui rend le traitement efficace. Aussi a-t-on cherché à adjoindre des substances retard aux antibiotiques.

Le premier excipient utilisé fut un mélange d'huile d'arachide et de cire d'abeille, cet adjuvant avait l'avantage de maintenir dans la mamelle un taux bactéricide pendant 48 heures alors que la même quantité de pénicilline en solution aqueuse ne le faisait que pendant 24 heures.

Ensuite d'autres substances ont été proposées, toujours plus efficaces: la rétention de procainate de pénicilline ou de pénicilline calcique est supérieure, lorsque l'excipient est composé d'huile minérale ou de stéarate d'aluminium, à ce qu'elle serait avec le mélange d'huile d'arachide et cire d'abeilles (79).

On ne saurait mieux résumer l'importance de l'effet inhibiteur d'un lait contaminé par les antibiotiques qu'en donnant l'essentiel des résultats des recherches menées par OVERBY sur cet effet en fonction de la durée d'élimination (62).

D. CONCLUSION A LA PREMIERE PARTIE

1° Une inhibition totale de la production d'acidité par un levain se produit si un lait de mélange contient:

- 2 % de lait de première traite d'une vache traitée depuis 8 heures par 200 mg d'auréomycine;
- 5 % de lait de première traite d'une vache traitée depuis 8 heures par 200 mg de streptomycine;
- 10 % de lait de première traite d'une vache traitée depuis 8 heures par 200 mg de terramycine;
- 10 % de lait de première traite d'une vache traitée depuis 8 heures par 50 000 U.I. de pénicilline.

2° Cet effet inhibiteur total persiste un certain temps, il se produit encore si un lait de mélange contient:

- 60 % de lait d'une vache traitée depuis 22 h par 200 mg d'auréomycine ;
- 80 % de lait d'une vache traitée depuis 32 h par 200 mg de streptomycine ;
- 80 % de lait d'une vache traitée depuis 46 h par 200 mg de terramycine ;
- 60 % de lait d'une vache traitée depuis 46 h par 50 000 U.I. de pénicilline.

3° Aux traites suivantes l'inhibition n'est plus totale, mais la production acide est retardée ; celle-ci ne redevient normale qu'à :

- La dixième traite, c'est-à-dire 118 heures après la fin du traitement avec l'auréomycine (200 mg) ;
- La huitième traite, c'est-à-dire 94 heures après la fin du traitement avec la streptomycine, la pénicilline, la terramycine (respectivement, 200 mg, 50 000 U.I. et 200 mg).

A la lumière de ces données, les recommandations qui sont faites aux producteurs de ne pas livrer le lait des traites suivant un traitement par les antibiotiques, deviennent évidentes.

La détermination du nombre de traites ou du temps qui doit s'écouler après un traitement, avant que la livraison et l'utilisation du lait ne soient possibles, a donné lieu à de nombreux travaux. La majorité des auteurs ont recommandé d'écarter le lait pendant un délai de 72 heures après la fin du traitement, certains même ont indiqué 96 heures lorsque l'auréomycine a été utilisée.

Ces chiffres s'entendent pour des doses thérapeutiques moyennes ; or les traitements actuels se font, dans certains cas, avec des doses massives et ils nécessiteraient des délais plus longs encore.

Ces recommandations qui peuvent souvent donner, au producteurs, l'impression d'un manque à gagner, ne signifient pas que, passé ces délais minimum, le lait d'une vache traitée ne soit plus contaminé.

Mais la dilution de ce lait dans des bacs de grand mélange arrive alors à atténuer ou à faire disparaître les effets des antibiotiques sur les levains lactiques ; il n'en reste pas moins que ces laits sont considérés comme falsifiés, aux termes de la loi.

DEUXIEME PARTIE

LES METHODES DE DETECTION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

De nombreuses recherches ont été tentées en vue de mettre au point des méthodes de détection dont la mise en œuvre soit possible dans les conditions de la pratique laitière. Ces méthodes doivent être simples et rapides, mais, en même temps, sensibles et fidèles.

Les recherches sont menées dans deux grandes voies :

— Les unes consistent à associer dans la préparation pharmaceutique l'antibiotique à des colorants dont la vue dans le lait signerait la présence de l'antibiotique. De nombreuses conditions s'imposent au choix d'un colorant : cet adjuvant doit être excrété par la mamelle dans le même temps que l'antibiotique et au même taux, il doit se répartir dans la totalité du lait et être aisément visible, il ne doit pas irriter la glande mammaire. Il doit, de plus, ne présenter aucun danger sur le plan de la santé publique. De nombreuses substances ont été proposées (29-33-71). aucune n'a encore été retenue.

— Les autres consistent en une recherche indirecte fondée soit sur la détection de modifications morphologiques des bactéries du lait, soit sur la mesure de la croissance des bactéries du lait, ou des produits du métabolisme de celles-ci.

Nous rappellerons les principales méthodes proposées dans cette voie et nous nous étendrons un peu plus sur les méthodes de diffusion en gélose que nous avons utilisées.

a) Tests fondés sur les modifications de morphologie des levains lactiques.

b) Tests fondés sur les modifications de métabolisme de micro-organismes mis en présence d'antibiotiques.

c) Tests fondés sur la diffusion en gélose des antibiotiques.

A. — TESTS FONDES SUR LES MODIFICATIONS DE MORPHOLOGIE DES LEVAINS LACTIQUES

L'action inhibitrice des antibiotiques sur les levains lactiques se traduit par des modifications de morphologie, visibles au microscope et dont certains auteurs ont voulu faire un moyen de diagnostic (59-78).

Les coques des streptocoques lactiques ont tendance à s'enfler, puis à prendre une forme bacillaire. Des micro-organismes tels que *Streptococcus cremoris* et *Streptococcus thermophilus* présentent des quantités respectives de 0.05 et 0.01 unité de pénicilline par millilitre de lait.

Ces germes ont été choisis par les auteurs de la méthode comme organismes tests étant donné leur grande sensibilité à la pénicilline. Ces tests sont rapides, mais ne sont pas très commodes à utiliser et, de plus, nécessitent un microscope.

B. — TESTS FONDES SUR LES MODIFICATIONS DE METABOLISME DE MICRO-ORGANISMES MIS EN PRESENCE D'ANTIBIOTIQUES

Deux critères ont été retenus :

1° Diminution du potentiel d'oxydo-réduction.

La mise en évidence de cette diminution se fait grâce aux réactions colorées données par les indicateurs d'oxydoréduction

tels que le bleu de méthylène, la resazurine, le chlorure de triphényltétrazolum.

Un levain lactique en phase de croissance réduit ces colorants ; il se produit un changement de couleur. Si des antibiotiques sont présents dans le lait, le levain lactique est inhibé dans son développement et le colorant ne se modifie pas.

Les méthodes utilisant ce critère sont sensibles et rapides dans l'ensemble, mais cette rapidité n'est obtenue qu'au prix de trop nombreuses et délicates manipulations.

2° Diminution de la transformation du lactose du lait en acide lactique par les levains lactiques.

La mise en évidence se fait de différentes façons :

— Mesures de l'abaissement du pH ou de l'augmentation de l'acidité titrable du lait ;

— Mesure du temps pour parvenir à la coagulation du lait par acidification ;

— Réactions colorées données par les indicateurs de pH tel que le pourpre de bromocrésol.

LE LAIT TEMOIN

Ces mesures de mise en évidence de la production acide n'ont de valeur que si elles sont comparées avec celles trouvées avec un lait témoin soumis aux mêmes conditions d'expériences. La constance des caractères du lait témoin est un point important de la méthode : il doit être frais, provenir d'un troupeau non traité par les antibiotiques et posséder les qualités requises pour une bonne production d'acide lactique (53). Ce peut être le lait d'une seule vache à qui l'on fera appel d'une manière constante (11) ou plus simplement un lait en poudre de bonne qualité, reconstitué à raison de 10 g de poudre pour 100 ml de liquide final (11-53). BERRIDGE a fait remarquer que l'organisme-test a une croissance plus grande dans du lait bouilli que dans du lait cru. Ceci se produit aussi avec certains laits en poudre en raison, sans doute, du traitement thermique subi par ceux-ci (11).

L'ORGANISME-TEST

L'organisme-test est constitué par un inoculum massif d'un levain lactique en phase de croissance dont on connaît la sensibilité aux antibiotiques.

Les effets des autres micro-organismes sont masqués par ceux de l'organisme-test en majorité écrasante.

Les déterminations acidimétriques ne sont possibles que pour des quantités d'antibiotiques inférieures aux doses qui inhibent complètement la fermentation lactique car c'est le retard de croissance qu'il est intéressant de noter.

Pour des quantités supérieures aux doses qui inhibent complètement la fermentation lactique, les auteurs recommandent de diluer le lait ; DOPTER (24), par contre, a entraîné des souches de *Str. lactis* à n'être sensibles qu'à ces fortes concentrations.

Dans la méthode initiale de HORALL et ELLIKER (34), l'organisme-test était constitué par un levain commercial. KOSIKOWSKI se servit de ce levain dans des études comparatives avec le test de diffusion en gélose (51-70). On a ensuite voulu augmenter la sensibilité de la méthode et réduire sa durée. Pour cela, on a préconisé des levains plus sensibles, c'est-à-dire des levains pour qui le seuil de toxicité au-dessous duquel ils ne sont pas affectés est plus bas. On a recherché en même temps des levains de croissance plus rapide que les levains lactiques habituels. On a proposé *Str. agalactiae*, *Str. lactis*, *Str. thermophilus* (10-11-18-46), *Lactobacillus bulgaricus*.

LA MISE EN ŒUVRE DU TEST ET LES RESULTATS ESCOMPTES

Pour simplifier le mode d'emploi du test, plutôt que de mesurer la quantité d'acide lactique formée avec de la soude diluée, il a été fait appel à des indicateurs de pH ou même, plus simplement, à la vérification de la présence ou de l'absence de coagulation du lait au bout d'un temps d'incubation donné (18-46).

Même en ayant détruit les substances inhibitrices thermolabiles, ces tests ne sont pas spécifiques pour les antibiotiques. D'une façon plus générale, ils renseignent sur la présence possible de substances inhibitrices thermostables naturelles ou thérapeutiques telle que les inhibitrices thermostables naturelles ou thérapeutiques telles que les indication est cependant essentielle pour l'industriel laitier.

Pour faire le diagnostic de "pénicilline", il est toujours possible de faire une contre-épreuve avec de la pénicillinase : c'est-à-dire que si les effets inhibiteurs de l'échantillon ne se font plus sentir en présence de pénicillinase, c'est qu'il contenait de la pénicilline, à présent inactivée.

BERRIDGE parvient même à estimer la concentration de la

pénicilline grâce à une série de contrôles témoins, où l'antibiotique est réparti à différentes dilutions (11).

Il a été proposé l'identification d'un antibiotique en particulier grâce à l'utilisation de souches de *Str. lactis* résistantes à un antibiotique. PIEN (66) fait acquérir cette résistance par des repiquages successifs dans des laits renfermant des concentrations de plus en plus élevées de l'antibiotique en cause.

De la même façon LEMOIGNE (57) avait utilisé des souches de *Str. lactis* qu'il avait accoutumées à la pénicilline et à la streptomycine. DOPTER (23) a pu faire acquérir l'accoutumance à l'auréomycine en partant des souches précédentes.

Quoiqu'il en soit, pourvu que l'on suive scrupuleusement le protocole indiqué, on connaît, pour chaque méthode, les limites de sensibilité vis-à-vis des antibiotiques. Elle est de 0,1 U.I. pénicilline avec le test de HORALL et ELLIKER, 0,04 U.I. pénicilline avec le test de KEOGH, 0,01 U.I. pénicilline et souvent 0,005 U.I. avec le test de BERRIDGE, 0,02 U.I. pénicilline, 0,50 γ auréomycine, 6,50 γ streptomycine, 0,70 γ terramycine, 0,90 γ tetracycline avec le test de COLLINS. Il faut souligner que plus les doses à déceler sont petites, plus les variations dans la technique affectent la valeur des résultats.

Ces tests d'activité des levains ont, à notre sens, le gros intérêt de fournir leurs résultats dans le temps : les plus fortes doses inhibitrices se révèlent plus tôt que les faibles doses. Or, pour les industriels laitiers, ce sont les plus fortes doses qui ont de l'importance. BERRIDGE (10) cite quelques chiffres révélateurs à cet égard :

— Après 30 mn d'incubation, il décèle 0,06 à 0,015 U.I. de pénicilline/ml ;

— Après une heure d'incubation, il décèle 0,015 U.I./ml ;

— Après de longues périodes d'incubation, il décèle des quantités aussi faibles que 0,0037 U.I./ml.

C. TESTS FONDES SUR LA DIFFUSION EN GELOSE DES ANTIBIOTIQUES

Dès 1941, le principe de la méthode est élaboré, il s'agit de la méthode "Oxford cup".

En 1944, VINCENT et VINCENT (74) conçoivent le remplacement des "cups" par des disques de papier.

C'est un procédé que nous utilisons pour la recherche des antibiotiques dans le lait depuis que plusieurs auteurs, en 1950, 1951 et 1952 ont étudié son application à l'industrie laitière (21-65-70).

L'épreuve avec disque de papier était déjà considérée comme la méthode de choix dans la dixième édition de « Standard methods for the examination of dairy products » publiée en 1953 (3). Dans la onzième édition de cette publication (1960), le procédé recommandé est encore la méthode de diffusion en gélose à partir de disques de papier.

Ce sont sa sûreté et sa simplicité qui lui valent ce privilège.

Principe de la méthode

Lorsqu'un antibiotique est placé à la surface de la gélose, il diffuse dans celle-ci.

Si cette gélose a été préalablement ensemencée avec un micro-organisme sensible à cet antibiotique, celui-ci empêche la croissance du micro-organisme là où il a diffusé.

Pratiquement, un disque de papier filtre est imbibé du lait dans lequel on soupçonne la présence d'antibiotique. Ce disque est déposé à la surface de la gélose déjà ensemencée par l'organisme-test. On met ensuite incuber la boîte de Petri, la diffusion de l'antibiotique se produit alors. Après un temps d'incubation donné, la présence de l'antibiotique se traduit autour du disque par une zone claire signifiant l'inhibition de l'organisme-test alors qu'ailleurs la croissance de celui-ci est visible. La diffusion de l'antibiotique est, en particulier, proportionnelle au logarithme de sa concentration sur le disque et l'on peut estimer cette concentration d'après la taille de la zone claire.

*
**

Nous allons, successivement, énumérer les éléments constitutifs indépendants de ce test et étudier ce que leur modification peut apporter sur le double plan de la rapidité et de la commodité d'une part, de la sensibilité et de la fidélité, d'autre part :

- 1° L'organisme-test ;
- 2° La quantité et la nature du milieu ;
- 3° La température et la durée de conservation des boîtes ensemencées ;
- 4° La température et la durée d'incubation des boîtes ensemencées ;

5° Les disques de papier ;

6° Le traitement des échantillons de lait.

Nous terminerons en évoquant le problème de l'interprétation des zones d'inhibition et en soulignant les points qui sont susceptibles de faire apparaître des difficultés de lecture.

*
**

Les éléments du test

Les chercheurs se sont appliqués, en choisissant tel ou tel micro-organisme, à rendre la méthode plus simple et plus rapide. Ils devaient rendre son utilisation possible pour des enquêtes portant sur un grand nombre d'échantillons, ou bien pour son emploi dans les conditions précaires du laboratoire de laiterie.

Pour reculer la limite de sensibilité de la méthode et pour la rendre fidèle, les efforts des chercheurs ont porté sur la détermination des facteurs qui interviennent dans les lois de diffusion en gélose.

1° L'ORGANISME-TEST

Le choix de l'organisme-test dépend évidemment de sa sensibilité aux antibiotiques, il devra être sensible aux plus petites quantités possibles.

SENSIBILITÉ SPÉCIFIQUE AUX ANTIBIOTIQUES.

Il n'existe pas de sensibilité spécifique aux antibiotiques seulement. Tous les micro-organismes sont inhibés non seulement par les antibiotiques, mais aussi par des substances telles que sulfamides, antiseptiques, ammonium quaternaire, sans compter les substances inhibitrices naturelles du lait. Mais nous devons tout de suite préciser que ces dernières substances sont thermolabiles et qu'il sera possible de les éliminer par un traitement approprié du lait. Par ailleurs, les antiseptiques sont habituellement présents à des doses si minimes qu'ils ne sont pas susceptibles d'interférer avec les quantités d'antibiotiques que l'on peut rencontrer (37).

Plus le micro-organisme choisi sera sensible à un grand

nombre d'antibiotiques, plus il aura la valeur d'un organisme-test de base pour la recherche des antibiotiques du lait. Mais il faut aussi que le seuil de sensibilité de cet organisme-test aux différents antibiotiques soit inférieur aux quantités d'antibiotiques que l'on est susceptible de rencontrer dans le lait.

Ces conditions sont difficiles à réunir ; nous avons recherché la sensibilité de *B. subtilis* ATCC 6633 à différents antibiotiques et nous avons trouvé :

Pénicilline	0,5 U.I. dans tous les cas		
Auréomycine	0,5 γ	»	»
Streptomycine	10 γ	»	»
Erythromycine	2,4 γ	»	»

L'organisme-test *B. subtilis* ne donne de résultat valable que pour la pénicilline : les autres antibiotiques sont déjà présents dans le lait à des concentrations néfastes alors que *B. subtilis* reste insensible à leur action.

JACQUET dispose d'un jeu de souches dont chacune est sensible ou résistante spécifiquement à un antibiotique, résistance naturelle ou artificielle obtenue par sélection de mutants (37).

Dans tous les cas, il faudra veiller à la fidélité de la réponse de ces organismes-tests car des mutations sont possibles. Il faudra tester leur degré de sensibilité à l'antibiotique d'une part, et vérifier leur sensibilité ou leur résistance à ce seul antibiotique, d'autre part.

PRÉPARATION FACILE DE L'ORGANISME-TEST.

SIMPLICITÉ D'EMPLOI DU TEST.

Cette condition est réalisée avec les spores de *B. subtilis* : elles se conservent très longtemps dans un milieu défavorable ; dans un milieu adéquat, elles se développent rapidement.

Des souches non sporulées ou les cellules végétatives des sporulés doivent, au contraire, être repiquées régulièrement et maintenues en phase de croissance. Alors que l'on peut produire des spores en une seule fois et les stocker, il faudra, dans le second cas, être à même de prévoir la préparation de la souche et le moment de l'examen.

KOSIKOWSKI (47) a soumis *Sarcina lutea* et *Staphylococcus aureus*, les organismes tests qu'utilisait le « Food and Drug Administration » (U.S.A.), à une anaérobiose stricte (atmosphère d'azote

ou vide). La conservation pendant treize jours dans ces conditions de boîtes ensemencées avec ces germes n'empêchait pas la survivance et la rémanence de la sensibilité à la pénicilline.

Plus tard, KOSIKOWSKI (56) montre que *B. subtilis*, avec un milieu pauvre en oxygène, perd sa sensibilité à la pénicilline.

Une autre modification élaborée par KOSIKOWSKI (48-54-55-58) donne naissance à une épreuve de routine simplifiée.

Intitulée épreuve du disque à phase inversée, elle consiste à ensemençer une gélose dépourvue d'éléments nutritifs avec des spores de *B. subtilis* (la germination ne se produit pas et quelle que soit la température de stockage des boîtes). Si l'on imprègne des disques de papier avec du milieu nutritif, la croissance bactérienne peut démarrer dès le moment où les disques humidifiés de lait sont appliqués sur la couche de gélose.

DÉVELOPPEMENT RAPIDE DE L'ORGANISME-TEST.

RAPIDITÉ DU TEST.

Les spores de *B. subtilis* présentent l'avantage d'un développement rapide lorsqu'elles sont placées dans des conditions optima ; la lecture est souvent possible après quatre heures d'étuve et parfois avant. JACQUET en utilisant une série d'organismes tests ne peut lire ses résultats qu'après dix-huit heures d'incubation.

Pour permettre une lecture plus précoce un certain nombre d'auteurs (41) ont recommandé de traiter les spores par la chaleur avant leur emploi. La germination est en général plus rapide en même temps que le taux de germination est augmenté et plus groupé dans le temps. Cette stimulation est liée à la température et au milieu dans lequel se trouvent les spores pendant le chauffage (30-31) ; le milieu et la température doivent être favorables. Il est donc recommandable non pas de chauffer les spores dans les ampoules tampon phosphate mais bien dans le milieu de culture lui-même.

Nous avons utilisé *B. subtilis* ATCC 6633 car il présente, en plus de sa commodité d'emploi, l'avantage d'être commercialisé. C'est un organisme-test de production parfaitement standardisé pour la recherche de pénicilline. Son inconvénient majeur est d'être cher et disponible seulement Outre-Atlantique : on préférera un acheminement par avion plutôt que par bateau car dans ce cas les longs délais de livraison ont pu modifier son taux de germination et le temps d'incubation nécessaire à celle-ci.

2. LA QUANTITE ET LA NATURE DU MILIEU

La nature du milieu intervient pour favoriser le développement de l'organisme-test. Avec *B. subtilis* ATCC 6633, les "Standard Methods", dans la onzième édition, laissent le choix entre deux milieux :

1° Bacto-Whey Agar ;

2° Bacto-Antibiotic Medium 1 (ou Penassay seed agar).

Le premier milieu a été utilisé par SILVERMAN et KOSIKOWSKI, le second par ARRET et KIRSHBAUM. C'est en grande partie grâce au milieu Penassay seed agar que ces derniers auteurs ont pu prétendre proposer un test rapide. JOHNS (41) a confirmé que la croissance de *B. subtilis* ATCC 6633 était bien plus lente avec le milieu Whey Agar.

Mais parallèlement la nature du milieu intervient pour modifier la sensibilité du test : avant que n'ait poussé l'organisme-test sur le milieu Whey Agar, l'antibiotique diffuse plus loin et, pour une concentration donnée de pénicilline, le diamètre des zones d'inhibition avec ce milieu est plus grand qu'avec le milieu Penassay seed agar. Il s'ensuit qu'en utilisant le milieu Whey Agar on peut déceler des quantités de pénicilline moindres qu'avec le milieu Penassay seed agar.

Plus encore que la nature du milieu, la quantité de milieu destiné à chaque boîte influence la sensibilité du test. Dans leur méthode initiale SILVERMAN et KOSIKOWSKI (68) employaient 12 ml de milieu, GOGAS et BICKNELL (26) 15 ml. JOHNS et BERZINS (42) rapportent qu'à la même époque DORNBUSH n'utilise que 4 ml, augmentant ainsi la sensibilité du test. WITTER (78), à son tour, démontre que plus la couche de gélose est épaisse moins le test est sensible. Ce qui revient à dire que plus la quantité de milieu est faible plus la sensibilité est augmentée. Ainsi, en utilisant 6, 10, 15 puis 20 ml de milieu, il obtient des zones d'inhibition de diamètres respectifs, 16, 13, 10 et 9 mm, avec une quantité donnée de pénicilline.

Le choix du milieu et de la quantité que l'on déposera dans chaque boîte se fait en fonction de la sensibilité que l'on désire. Pour obtenir un diamètre constant de la zone d'inhibition pour une concentration donnée de pénicilline, certaines précautions doivent être respectées. Elles sont nécessaires si l'on prétend faire un dosage quantitatif en se reportant à une courbe étalon, réalisée

dans les mêmes conditions. La quantité de milieu destinée à chaque boîte doit être mesurée avec précision. Les boîtes devront avoir un fond plat pour que l'épaisseur de la gélose soit uniforme et il faudra permettre à celle-ci de se solidifier horizontalement.

3. LA TEMPERATURE ET LA DUREE DE CONSERVATION DES BOITES ENSEMENCEES

Ceci est un problème de commodité, soulevé beaucoup moins par la pratique d'une enquête que par la pratique du laboratoire de diagnostic. Là où les examens sont en nombre restreint il arrive que le conditionnement des spores permette, si on veut les utiliser toutes, de préparer plus de boîtes qu'on n'en a besoin.

ARRET et KIRSHPAUM (4) ont pensé qu'il y avait même un avantage à préparer les boîtes à l'avance, et dans leur méthode recommandent de ne pas utiliser les boîtes avant trois jours de conservation, sans dépasser le temps de cinq jours. Dans une première publication (4) les auteurs demandaient que cette conservation se fasse à 15° C puis, dans une seconde (5), ils préférèrent la température du réfrigérateur. Cette manière de procéder doit, selon les auteurs, permettre une lecture plus précoce si en même temps la température de 37° C est observée pour l'incubation des boîtes.

Ces assertions ont suscité chez plusieurs auteurs des vérifications qui ont eu le mérite de répondre à la question soulevée par le titre de ce paragraphe.

Pour WITTER (80) la fidélité du test est relativement indépendante de la température de conservation. Le mieux serait une conservation à 15 °C mais quelques jours seulement, car, alors, l'organisme-test se développe, rendant les boîtes inutilisables. Pour JOHNS (40) après deux jours à 15 °C, si même la croissance n'est pas visible, aucune zone n'apparaît pour des concentrations de pénicilline qui, dans les conditions normales, auraient provoqué une zone d'inhibition.

A cet égard, plus la température de conservation est basse, meilleurs sont les résultats. Cependant JOHNS (41) souligne l'inconvénient de conserver les boîtes à la température du réfrigérateur lorsque le milieu Whey Agar est utilisé : en effet, après deux ou trois jours de conservation à cette température, l'incubation doit durer sept heures quand quatre à six heures suffisent lorsque les boîtes sont préparées extemporanément. Cet inconvénient n'existe pas avec le milieu Penassay Seed Agar si, toutefois, la conservation n'excède pas cinq jours à 4 °C.

Pour WITTER (80) la durée maximum de conservation est en relation avec l'état de déshydratation des boîtes ; après neuf jours à 10 °C, la gélose s'est desséchée et devient inutilisable.

La méthode d'ARRET et KIRSHBAUM réclame un minimum de conservation des boîtes ensemencées avant de les utiliser : trois jours. WITTER, toujours, a constaté que les résultats sont identiques, que l'on utilise une boîte conservée six à dix jours, ou une boîte conservée un à cinq jours.

En conclusion, on peut préparer un lot de boîtes à l'avance, si l'on ne craint pas de voir augmenter la durée d'incubation ; ces boîtes devront être conservées à la température du réfrigérateur et utilisées avant que la gélose ne soit déshydratée.

4° LA TEMPERATURE ET LA DUREE D'INCUBATION DES BOITES ENSEMENCEES

La température d'incubation des boîtes ensemencées sur lesquelles ont été posés les disques de papier imprégnés de lait, dépend de deux facteurs : de l'organisme-test lui-même et des étuves dont on dispose.

De cette température dépend la durée d'incubation, donc de la précocité de lecture des résultats. La lecture sera d'autant plus précoce avec un organisme-test que l'on se rapprochera de la température optimum de développement de celui-ci. Avec *B. subtilis* ATCC 6633, les résultats sont lisibles plus rapidement à 35 °C ou 37 °C qu'à 32 °C.

Pour ce même micro-organisme, la méthode standard (3) recommande 35° C et la méthode préconisée par ARRET et KIRSHBAUM requiert 37° C (4). Or, dans le premier cas, la lecture se fait au bout de quatre à six heures et, dans le second cas, les auteurs ont assuré que la croissance était déjà visible après 2 h 30 d'incubation.

WITTER (80) s'est élevé contre cette assertion et il indique qu'après 2 h 30 d'incubation, un petit nombre de boîtes seulement montre une croissance de l'organisme-test suffisante pour que la lecture soit possible. De ce fait, la durée d'incubation devant être sensiblement aussi longue à 37° C qu'à 35° C, il est finalement recommandé une incubation à 35° C lorsque le test est effectué en laiterie puisque des étuves réglées à cette température y sont couramment utilisées.

Nous avons fait incuber nos boîtes à 37° C car ce sont des étuves réglées à cette température dont nous disposons.

5° LES DISQUES DE PAPIER

Le diamètre des zones d'inhibition est en relation directe avec la concentration de l'antibiotique sur le disque ; la quantité de lait absorbée par celui-ci influence, de ce fait, la sensibilité de la méthode.

Un certain nombre d'auteurs ont proposé des modifications pour abaisser la limite de sensibilité de la méthode aux antibiotiques. Ces modifications portent sur la qualité du papier, le diamètre et l'épaisseur des disques.

La controverse de la taille des disques a duré longtemps, car, si les disques plus grands absorbent beaucoup plus de lait, ils occupent plus de place sur une boîte de Pétri et permettent moins d'examens pour une même quantité de milieu et d'organisme-test, le prix de revient de l'examen s'en trouve augmenté.

La superposition de deux disques a été préconisée par Joséphine CERNY (17) : de cette façon, deux disques de 1,27 cm (0,50 inch.) de diamètre retiennent dix fois plus de lait qu'un seul disque de 0,63 cm (0,25 inch.) de diamètre.

Mais l'importance du diamètre des disques, plus que leur superposition sur la sensibilité de la méthode a été mise en évidence par SHINO (69). On décèle invariablement avec les disques de 1,27 cm une concentration de 0,025 U.I. de pénicilline par millilitre de lait : à cette même concentration, les résultats sont négatifs ou douteux avec les disques de 0,63 cm (41). Les disques de 0,63 cm décèlent 0,05 U.I. de pénicilline. Là où les disques de 1,27 cm décèlent 25 échantillons positifs, les disques de 0,63 cm n'en décèlent que 15 (69).

Tous les auteurs s'accordent à dire que le test utilisant des disques de 0,63 cm n'est valable que pour la recherche de la pénicilline car il n'est pas assez sensible avec les autres antibiotiques.

Ainsi JOHNS (42) a donné les chiffres suivants avec l'auréomycine :

- Les disques de 1,27 cm décèlent 0,025 γ ;
- Les disques de 0,63 cm décèlent 0,125 γ ;

Pour augmenter la quantité de lait sur les disques, JOHNS maintient les disques pendant vingt secondes contre le bout d'une pipette contenant l'échantillon.

En remplaçant les disques par des comprimés de lait desséché sous vide, deux auteurs sont arrivés à déceler 0,01 U.I. pénicilline par millilitre (52).

En France, l'on dispose, dans le commerce, de disques de 0.9 cm et 1.3 cm de diamètre. Nous avons utilisé les disques de 0.9 cm pour la raison mentionnée plus haut (prix de revient) d'autant qu'ils nous permettaient de déceler 0.05 U.I. pénicilline/ml de lait, limite des doses provoquant des ennuis dans l'industrie fromagère.

Le choix de la taille du disque dépend donc de la sensibilité que l'on veut obtenir. De plus, le pouvoir absorbant de chaque disque doit être comparable à ceux qui ont servi à réaliser la courbe étalon. Ceci est nécessaire si l'on veut que la quantité de lait qui sera absorbée soit constante, et donc que les renseignements fournis soient quantitatifs et fidèles.

Du papier filtre est utilisé pour la confection des disques. GERWE (25) vérifiant la fidélité des résultats donnés par des disques pour antibiogramme provenant d'un même lot de fabrication a trouvé des variations qu'il ne put que rapporter à des variations du papier lui-même. Il trouva des variations de poids atteignant 11 % entre différents disques vierges et jusqu'à 19 % avec des disques qu'il sature lui-même avec une solution antibiotique.

Si l'on a présent à l'esprit que le taux de diffusion est proportionnel au logarithme de la concentration, la variation de la quantité de lait sur un disque, et donc d'antibiotique, se traduira par une variation dans le diamètre de la zone d'inhibition d'autant plus grande que les doses d'antibiotiques dans l'échantillon seront plus petites.

La rigueur voudrait que l'on dépose une quantité constante de l'échantillon à analyser sur le disque, c'est ce que, primitivement, commandaient de faire SILVERMAN et KOSIKOWSKI (70) avec une micropipette.

Mais cette exigence est difficilement conciliable avec la pratique de l'examen d'un grand nombre d'échantillons.

Les "Standard Methods" (3) prescrivent de saturer les disques en les plongeant, tangentiellement à la surface du lait : celui-ci imprègne le disque par capillarité et, avec un peu de pratique, on sait à quel moment doit cesser le contact pour que le disque ne soit pas sursaturé. C'est cette manière de procéder que nous avons utilisée.

6° LE TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE LAIT

En plus des substances inhibitrices apportées par la thérapeutique des mammites, il en est d'autres, naturelles et normalement présentes dans le lait.

Elles sont représentées par la lacténine (6-7-8-9-43), dont une fraction est thermolabile (à 70° C pendant 20 mn) : or, les deux fractions sont nécessaires pour obtenir une inhibition maximum de *Streptococcus lactis*. Elles sont aussi représentées par une autre substance thermolabile, de nature enzymatique sans doute, associée aux globules gras et observée par JACO (38).

D'autre part, les bactériophages, les bactéries qui gênent la fermentation lactique, la plupart des substances antigéniques secrétées par l'animal ne résistent pas au chauffage à 90-95° C (66). A cette température, les antibiotiques et les antiseptiques introduits dans le lait sont respectés.

Il est important pour l'industriel laitier de savoir si l'inhibition constatée est due à un agent thermostable ou non. Aussi est-il recommandé de pasteuriser les échantillons de lait à analyser à 82° C pendant cinq minutes avant d'en imbiber les disques ; ceci permet d'éviter de voir interférer les effets des substances inhibitrices thermolabiles énumérées plus haut.

OVERBY (63) a fait le bilan des recherches menées au sujet de la répercussion de la pasteurisation du lait sur l'activité des antibiotiques qu'il contient : aux températures et temps observés dans l'industrie, les antibiotiques demeurent intacts. A la température de 82° C l'auréomycine, la chloromycétine, la streptomycine, la terramycine, la pénicilline ne sont pas affectées dans leur activité.

Avant de procéder à l'examen, les échantillons doivent être bien agités pour disperser les globules de graisse. La répartition des antibiotiques dans les différents constituants du lait n'est pas homogène, ainsi 80 à 90 % de la pénicilline est concentrée dans la phase aqueuse s'il s'agit de pénicilline sodique ou potassique.

Interprétation des zones d'inhibition

WOLIN et KOSIKOWSKI (81-82), en utilisant *B. subtilis* et un milieu au lactosérum (Whey Agar) ont montré qu'en général le lait cru est doué de propriétés inhibitrices vis-à-vis des bactéries. Dans le test de diffusion en gélose un tel lait produit des zones d'inhibition que l'on pourrait confondre avec les zones produites par les antibiotiques. Cependant, ces auteurs ont donné une description de ces zones, elles ont des caractères particuliers et, de plus, ne se produisent plus si l'on a pris la précaution de chauffer le lait.

Récemment KOSIKOWSKI (50) a constaté que l'apparition de

ces fausses zones était liée au milieu de culture utilisé. Pratiquement les fausses zones qui apparaissent avec le lait cru se produisent sur le seul milieu Whey Agar. Lorsque la gélose du test à "phase inversée" ou le Penn Assay Agar sont utilisés, ces fausses zones n'apparaissent pas.

Cependant, au cours de notre enquête, malgré une pasteurisation systématique des échantillons pour éviter l'inconvénient ci-dessus mentionné, nous avons constaté des fausses zones d'inhibition. Ces zones étaient différentes de celles causées par les antibiotiques et de celles décrites par WOLIN et KOSIKOWSKI. Lorsqu'on faisait un double de l'épreuve pour les échantillons suspects, les zones n'apparaissaient plus. Nous avons montré que le caoutchouc des capuchons des tubes de conservation de notre milieu (Whey Agar) en était le responsable. La réhydratation du milieu grâce à une décoction des rondelles de caoutchouc incriminées, ajoutée à différentes concentrations nous a permis de reproduire ces "fausses zones", assez différentes entre elles selon la concentration.

Dans tous les cas, une première zone, de stimulation, juxtant le disque est présente. Elle est de taille variable et uniquement représentée, dans le cas de la concentration la plus forte, par quelques rares colonies. Par contre, la deuxième zone, d'inhibition, concentrique à la précédente, varie avec la concentration. L'inhibition est totale avec la plus forte concentration, elle est partielle dans les autres cas. Sa taille augmente en même temps que la concentration pour atteindre toute la boîte dans le cas de la concentration maximum.

Nous ne saurions dire si concurremment le lait intervient sur cette deuxième zone ; il le semble puisque nous avons constaté, au cours de notre enquête, que sur une même boîte la taille de cette deuxième zone variait avec les différents échantillons. Nous n'avons relevé aucune différence de pH entre ces échantillons.

Les zones d'inhibition dues aux antibiotiques sont mesurées et cette valeur, représentée par le diamètre de la zone, y compris le disque, renseigne sur la concentration de l'antibiotique sur le disque de papier. La précision de cette mesure dépend de la netteté de la limite des zones : en dépit de l'opération supplémentaire (chauffage du lait) lorsqu'on utilise le milieu au lactosérum, KOSIKOWSKI y demeure fidèle car, avec ce milieu, la limite des zones d'inhibition est exceptionnellement nette. Il est, d'autre part, nécessaire de faire la lecture après une incubation de quatre à six heures, tel qu'il est recommandé dans le mode opératoire. Une incubation prolongée peut faire apparaître des artéfacts tels que des cercles concentriques d'inhibition plus ou moins nombreux — ce qui rend l'interprétation des résultats particulièrement difficile. Si, au bout de six heures,

la croissance n'est pas encore visible, il vaut mieux soustraire les boîtes à l'incubation et les laisser sur la paille, à la température du laboratoire.

En conclusion, les différents temps et recommandations particulières à la méthode de diffusion en gélose doivent être scrupuleusement respectés car les moindres changements peuvent se répercuter soit sur la taille, soit sur la limite des zones d'inhibition.

TROISIEME PARTIE

L'ENQUETE PROPREMENT DITE

A. — LA METHODE EMPLOYEE

1° Principe.

C'est le principe général du procédé de diffusion en gélose tel qu'il a été exposé plus haut. On fait une évaluation quantitative de la pénicilline.

2° Matériel.

MILIEU DE CULTURE.

Bacto-Whey Agar dehydrated (B 34, DIFCO) + 0.1 % Bacto-Yeast Extract (B 127, DIFCO) pour ses propriétés stimulantes de la germination.

ORGANISME-TEST

Bacto-Subtilis Spore Suspension ATCC-6633 (B 453, DIFCO).

DISQUES DE PAPIER

Papier technique DURIEUX N° 268.

Disques de 0,9 cm de diamètre, stérilisés par autoclavage.

BOITES DE PÉTRI

Boîtes de Pétri à fond plat, diamètre 10,0 cm.

3° Mode opératoire.

PRÉPARATION DES BOITES

- Répartir le milieu, à raison de 12 ml, dans des tubes bouchés par un tampon de coton ; stériliser à 120 °C pendant 15 mn ;
- Pipetter, dans la boîte de Pétri, l'inoculum constitué par six gouttes de suspension ;
- Verser le milieu porté à 50-60 °C ; mélanger milieu et spores en imprimant à la boîte des mouvements circulaires et transversaux ;
- Laisser solidifier la gélose sur une surface bien plane.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

- Chauffer les échantillons à 82° C, pendant 3 à 5 mn, puis refroidir dans un bain-marie d'eau froide ;
- Prendre un disque de papier stérile au moyen de pinces sèches et propres ;
- Maintenir le disque tangentiellement à la surface de l'échantillon (le lait imprègne le disque par capillarité) : éviter la sursaturation ;
- Disposer aussitôt le disque à plat à la surface de la gélose. On a placé neuf disques par boîte.

INCUBATION DES BOITES

- Retourner les boîtes et faire incuber à 37° C ;
- Après quatre à six heures d'incubation, procéder à la lecture des résultats. Vérifier si une zone d'inhibition autour des disques est présente ou non.

CONTRE-ÉPREUVE ET ESTIMATION DE LA CONCENTRATION

Si l'on constate une zone d'inhibition, on répète le test. Pour cela, sur la même boîte sont disposés :

- Un disque imprégné de l'échantillon suspect ;
- Un disque imprégné de l'échantillon et de pénicilline ;
- Un disque imprégné d'une solution standard, titrant 1,0 U. de pénicilline par millilitre de lait.

Si, alors, on n'observe pas de zone autour du disque imprégné de pénicilline, on peut affirmer que l'échantillon contient de la pénicilline.

Le disque imprégné de la solution standard permet de calculer la correction qu'il faudra apporter à la lecture du diamètre de la zone provoquée par l'échantillon. En effet, si un facteur tendait à diminuer ou à augmenter la taille de la zone d'inhibition de la solution standard, il exercerait la même action sur la taille de la zone d'inhibition de l'échantillon.

4° Etablissement de la courbe étalon.

Pour réaliser la courbe étalon nous avons utilisé du *Benzyl pénicillinate de sodium* cristallisé (*Spécilline G* de SPÉCIA, présentation renfermant 200.000 U.I.).

Le liquide de dilution, sauf pour les dilutions finales, est une solution de tampon phosphate de pH 6.

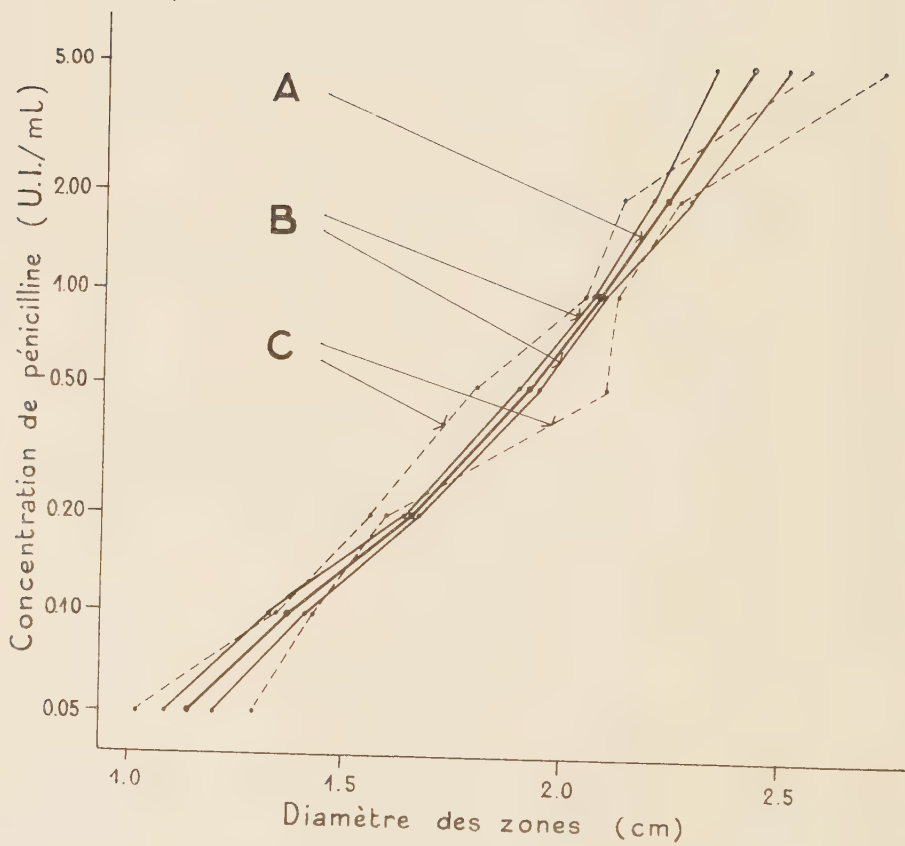
Les dilutions finales se font dans le lait car la plupart des antibiotiques sont liés dans une certaine mesure aux protéines ; de ce fait, les dilutions étalons doivent nécessairement se faire dans le même véhicule que celui sur lequel les recherches ultérieures seront faites. Le lait servant à ces dilutions doit être exempt de substances inhibitrices. Les dilutions finales titrent : 0,05 U.I./ml ; 0,1 U.I. ; 0,2 U.I. ; 0,5 U.I. ; 2,0 U.I. ; 5,0 U.I.

Pour la détermination de chaque point de la courbe, sauf pour la concentration 1,0 U.I./ml, on a utilisé trois boîtes de Pétri.

Sur chacune de ces trois boîtes ont été disposés, en alternance, trois disques imprégnés de la concentration à déterminer et trois disques imprégnés de la concentration 1,0 U.I./ml.

La moyenne des valeurs trouvées sur toutes les boîtes pour la concentration 1,0 U.I./ml détermine le point de référence. Le point de référence permet d'apporter une correction aux valeurs trouvées sur une boîte pour une concentration donnée. C'est en comparant la valeur donnée par cette boîte pour la concentration 1,0 U.I./ml avec le point de référence que la correction est possible. Cette méthode de correction est expliquée en détail dans le livre de GROVE et RANDALL (27).

Comme on peut le constater en consultant la courbe étalon que nous avons réalisée, l'intervalle de confiance, lorsqu'on a apporté



ces corrections, est singulièrement plus étroit qu'avec les données brutes.

Cette correction tend à éliminer les facteurs de variation, liés à la boîte elle-même : profondeur de la gélose, taille de l'inoculat, degré d'humidité, taux d'imprégnation des disques, constance de l'épaisseur de gélose...

Ces deux derniers facteurs se sont révélés être peu importants. Sur une même boîte, une différence de diamètre de zone pour deux disques imprégnés de la même dilution et qui ne pourrait s'expliquer que par une variation de ces deux facteurs, a été très peu souvent rencontrée.

Le choix des dilutions, pour réaliser la courbe étalon, dépend de la méthode, elle-même sous la dépendance des facteurs que nous venons d'énumérer. Nous avons limité inférieurement la courbe au point 0,05 U.I. /ml car nous avons toujours été capables de déceler cette concentration. Il n'en aurait pas été de même pour des concentrations de 0,01 U.I./ml que nous n'avons pu déceler d'une façon constante. Ainsi exprimerons-nous nos résultats en donnant comme limite inférieure 0,05 U.I./ml qu'il faut donc comprendre grossis par quelques concentrations plus basses. Nous avons limité supérieurement la courbe au point 5,0 U.I./ml car, pour des concentrations plus fortes, les variations de concentrations ne se traduisent plus par des variations notables du diamètre des zones d'inhibition. De plus, il était peu probable que nous rencontrions de telles quantités dans le lait des bidons livrés aux laiteries.

B. — LES RESULTATS

1° Les zones dans lesquelles a été menée l'enquête.

L'enquête s'est déroulée dans trois régions françaises différentes.

Ces régions ont été choisies parce qu'elles diffèrent par leur mode d'élevage et qu'elles sont le reflet de trois types de production laitière.

Nous avons aussi été guidé dans ce choix par la nécessité de trouver un laboratoire où nous pourrions effectuer nos examens.

Nous tenons à remercier, pour leur accueil et pour leurs

démarches auprès des laiteries où nous avons effectué nos prélèvements :

— M. Portmann, du Laboratoire de Technologie Laitière de Surgères. Les Professeurs de l'Ecole d'Industrie Laitière de Surgères (Charente-Maritime) ;

— M. Rousseau, de la Station Expérimentale Laitière de Poligny (Jura) ;

— M. Sainclivier, du Laboratoire des Recherches de Technologie Laitière de l'Ecole d'Agriculture de Rennes (Ille-et-Vilaine).

Nous avons été amené à effectuer nos prélèvements sur les tournées de ramassage de onze laiteries ainsi réparties :

En Charente-Maritime, dans les *laiteries coopératives* de :

— BOIS HARDY,	— TONNAY BOUTONNE,
— SURGÈRES,	— VOUHÉ.
— THAIRÉ D'AUNIS,	

En Ille-et-Vilaine, dans les *laiteries industrielles* suivantes :

— FROMAGERIE DELISSE, à Montauban-de-Bretagne,
— ETABLISSEMENTS ROGER LANQUETOT & FILS, à Vern-sur-Seiche.

Dans le Jura, dans les "*fruitières*" de :

— BIEF DU BOURG,	— VADANS
— CHISSEY,	— VILLER FARLEY.

et à la *laiterie industrielle* de DOLE.

Nous remercions ici, les propriétaires, administrateurs et responsables de ces établissements de toutes les facilités qu'ils nous ont données et de leur excellent accueil.

Les laiteries coopératives de Charente-Maritime et les laiteries industrielles d'Ille-et-Vilaine énumérées fabriquent fromage et beurre; les "*fruitières*" du Jura du fromage, le Gruyère de Comté.

Les prélèvements à la laiterie industrielle de Dole ont été effectués sur une tournée de ramassage de lait destiné à la consommation humaine, mais l'usine fabrique aussi fromages et beurre.

Dans tous les cas la présence d'antibiotiques dans le lait peut poser des problèmes de fabrication.

Dans les laiteries, sauf dans les "*fruitières*" du Jura, le ramassage du lait se fait une fois par jour, le matin, tout au moins à l'époque où nous étions, l'hiver.

Dans les "*fruitières*", conformément aux usages locaux, loyaux et constants et à la législation en vigueur le lait est apporté à l'atelier de fabrication dans les plus brefs délais après chaque traite. Il y a

donc ainsi deux "coulées" par jour. L'apport du soir est conservé au frais par les soins du fromager, jusqu'au lendemain, réparti dans des bacs, les "rondeaux".

La quantité de lait traité par jour, dans les laiteries visitées, est moyenne, en 10 et 30.000 litres ; dans les "fruitières" du Jura, elle est seulement de 1.500 à 2.000 litres.

L'individualisation des bidons par producteur nous importait car nous voulions pouvoir exprimer nos résultats par le pourcentage de producteurs responsables de la livraison de lait contaminé.

A leur arrivée à la laiterie, les bidons étaient individualisés par producteur en Charente-Maritime, dans les fruitières du Jura et en Bretagne, sauf aux établissements Lanquetot où ceci fut exceptionnellement réalisé pour nous servir.

A la laiterie industrielle de Dole, les bidons ne sont pas individualisés par producteurs à leur arrivée sur le quai de la laiterie ; aussi, avons-nous dû effectuer nos prélèvements chez les producteurs, juste avant le ramassage par le laitier.

Dans les trois régions où porte l'enquête l'importance des troupeaux et le mode d'élevage ne sont pas semblables.

— *En Charente-Maritime,*

30 %	des producteurs	livrent moins de 40 l de lait/jour
50 %	»	» de 60 à 100 l de lait/jour
20 %	»	» plus de 120 l de lait/jour

— *En Ille-et-Vilaine,*

83 %	des producteurs	livrent moins de 40 l de lait/jour
15,5 %	»	» de 60 à 100 l de lait/jour
1,5 %	»	» plus de 120 l de lait/jour

-- *Dans le Jura,*

Dans le Jura, les quantités de lait apportées au "chalet" par les producteur varient entre 5 et 80 litres, la majorité livre entre 30 et 40 litres.

L'époque au cours de laquelle nous avons effectué nos prélèvements dans le Jura, coïncidait avec la période des vèlages. Par contre, les vèlages n'avaient pas encore eu lieu, lors de notre séjour en Charente-Maritime et en Bretagne.

2° Les résultats proprement dits.

RESULTATS I. — Pourcentage des bidons, livrés aux laiteries, contenant des substances inhibitrices thermostables.

Epoque	Région	Nombre d'échantillons de laits examinés (a)	Laits contenant 0,05 U ou plus de pénicilline par ml de lait		Laits contenant un autre inhibiteur thermostable	
			Nombre	%	Nombre	%
Janvier 1962	Charente-M ^{me}	848	10	1,18	4	0,47
Février 1962	Ille-et-Vilaine	1.242	0	0	0	0
Mars 1962	Jura (fruitière)	307	0	0	0	0
Mars 1962	Jura (Dole)	316	1	0,31	0	0

(a) Les échantillons sont constitués par un prélèvement par bidon de 20 litres de lait.

Sur 2.713 échantillons, onze laits seulement contenaient 0,05 U.I. ou plus de pénicilline par millilitre de lait, soit un pourcentage de 0,40.

Ces résultats peuvent aussi être exprimés, puisque nos échantillons proviennent de bidons individualisés, par le pourcentage des producteurs ayant livré du lait contaminé.

RESULTATS II. — Pourcentage des producteurs livrant aux laiteries des laits contaminés par la pénicilline.

- *En Charente-Maritime,*

Sur 222 producteurs, 6 ont livré du lait contaminé, soit 2,70 %.

- *En Ille-et-Vilaine,*

Sur 749 producteurs aucun n'a livré de lait contaminé, soit 0 %.

- *Dans le Jura ("fruitières")*

Sur 111 producteurs aucun n'a livré de lait contaminé, soit 0 %.

- *Dans le Jura (Dole),*

Sur 121 producteurs, un a livré du lait contaminé, soit 0,83 %.

RESULTATS III. — Concentrations de pénicilline dans les échantillons contaminés.

Diamètres des zones d'inhibition			Concentrations correspondantes
Mesures sur la même boîte (valeurs brutes)		Corrections (a)	
Echantillons contaminés	Dilution 1,0 U.I./ml standard	Echantillons contaminés	
1,95 cm	2,00 cm	2,03 cm	0,85 U.I./ml
2,10 »	2,20 »	1,98 »	0,65 »
1,55 »	2,00 »	1,63 »	0,18 »
1,45 »	1,95 »	1,58 »	0,16 »
1,50 »	2,20 »	1,43 »	0,10 »
1,30 »	1,95 »	1,43 »	0,10 »
1,40 »	—	1,40 »	0,10 »
1,30 »	2,10 »	1,28 »	0,08 »
1,20 »	2,00 »	1,28 »	0,08 »
1,00 »	2,00 »	1,08 »	0,05 »
1,00 »	2,00 »	1,08 »	0,05 »

(a) Corrections effectuées selon la méthode de GROVE et RANDALL (27), le point de référence. (1,0 U.I./ml) a la valeur : 2,08 cm.

C. — DISCUSSION DES RESULTATS

1° LES RESULTATS ETRANGERS

Nous avons à dessein fait suivre nos résultats de ceux qui ont été publiés par les auteurs des enquêtes étrangères.

Nous avons choisi pour constituer ce tableau les résultats des enquêtes établies avec des méthodes de sensibilité équivalente — Les échantillons ont été prélevés pour nombre d'entre eux, comme cela est indiqué, sur les mêmes unités de conditionnement, les bidons de livraison — les résultats exprimés par pourcentage de producteurs responsables sont plus difficiles à comparer aux nôtres car l'importance des fournitures par producteurs n'est pas indiqué par les auteurs.

RESULTATS IV. — Les enquêtes étrangères.

Année	Pays	Nombre d'échantillons de laits examinés	Lait contenant de la pénicilline (en %)		Références
			Lait de producteur	Laits de bidon	
1951 (a)	U.S.A.	1.794	6,0		51
1959 (b)	U.S.A.	1.170	3,7		39
1959 (a)	U.S.A.	200	6,5		49
1960 (a)	U.S.A.	1.634	4,0		49
1951					
1953 (c)	G.-B.	1.500		1,5 à 3,0	72
1954					
1955 (d)	G.-B.	5.000	13,7(d)	5,0	12
1954					
1956 (e)	G.-B.	238		4,2	64
1954					
1956 (e)	G.-B.	4.071	3,1 (e)		64

(a) Méthode DIFCO ; organisme test *B. subtilis*, sensible à 0,05 U/ml.

(b) Méthode Arret et Kirshbaum; organisme test *B. subtilis*, sensible à 0,05 U/ml.

(c) Méthode sensible à 0,03 U/ml ; organisme test *Sarcina lutea*.

(d) Méthode Berridge ; organisme test *Str. thermophilus*, sensible à 0,01 U/ml.

Sur les 13,7 %, seulement 3,7 % contiennent plus de 0,04 U/ml.

(e) Méthode sensible à 0,05 U/ml.

Le chiffre de 3,1 % représente et des laits de producteurs et des laits de bidon.

La différence est grande entre les résultats étrangers et les nôtres. Dans presque tous les cas, c'est dix fois plus souvent qu'en France que du lait contaminé est livré aux laiteries en Grande-Bretagne.

Aussi est-il nécessaire de déceler l'origine de cette différence ou pour le moins de dégager ce qui peut expliquer le pourcentage faible de lait contaminé que nous avons constaté.

2° LA METHODE UTILISEE

La méthode que nous avons utilisée n'est pas à mettre en cause car elle s'est révélée fidèle pendant toute l'enquête : lorsque la pénicilline était décelée, un disque imprégné d'une solution standard

de pénicilline nous permettait de constater que la sensibilité était constante et d'estimer la concentration dans l'échantillon.

Il nous faut cependant rappeler les limites qui sont assignées à cette méthode : elle ne peut valablement déceler que la pénicilline, les autres antibiotiques ne le sont que pour des concentrations supérieures presque toujours à ce que l'on peut espérer trouver dans le lait.

Sur quinze échantillons présentant une zone d'inhibition, onze contenaient de la pénicilline, prouvée par la pénicillinase.

3° LA FREQUENCE DES MAMMITES

La fréquence des mammites dépend de deux facteurs :

- de la période de lactation ;
- du soin apporté par les trayeurs.

Notre enquête s'est déroulée en hiver et en dehors des périodes de vêlage. Or les mammites sont plus fréquentes au printemps et dans la période suivant la mise bas. En l'absence de données, à cet égard par les enquêteurs étrangers, nous nous bornerons à dire ce que nous avons constaté en France.

Les troupeaux des zones dans lesquelles ont été effectués les prélèvements sont en général peu importants, mais c'est la Charente-Maritime qui nous a fourni presque tous nos résultats positifs, là justement où la production est la plus forte.

Ceci peut s'expliquer par des raisons d'épidémiologie et des raisons strictement humaines.

Dans un grand élevage la probabilité d'infection est plus grande que dans un petit élevage ; la détection de la vache malade est plus difficile et plus tardive que dans un petit élevage : entre temps la contagion a pu avoir lieu et donc des mammites se déclarer.

Dans un petit troupeau la chute de production d'une seule vache modifie sensiblement la production totale de lait de l'élevage, ce n'est pas le cas dans un grand troupeau. De plus, dans une petite exploitation, c'est toujours le propriétaire lui-même qui effectue la traite. Celle-ci y est habituellement manuelle et le danger de contagion grâce à une machine à traire mal utilisée n'existe pas.

Savoir à quelle période de l'année et dans quelles exploitations, du point de vue de leur importance, les enquêtes étrangères ont été faites pourrait peut-être expliquer la différence de résultats constatée.

4° L'EDUCATION DES PRODUCTEURS

Serait-ce que les Français ont une plus grande conscience du danger des répercussions des antibiotiques dans le lait ?

Nous ne savons quelle était la destinée du lait dans les zones sur lesquelles ont porté les enquêtes étrangères.

En France le lait était destiné à la fabrication de beurre ou de fromage. Les prélèvements qui ont été faits sur du lait destiné à la consommation humaine ne sont pas assez nombreux pour qu'ils puissent être comparés aux autres prélèvements. Cependant, si le laitier réservait ce lait à la consommation humaine, c'était pour éviter dans la fabrication de fromage des accidents variés mais aussi parce qu'il soupçonnait la présence d'antibiotiques. Il avait trouvé, à deux reprises, des particules de crayons aux antibiotiques dans les bidons.

La prise de conscience du danger des antibiotiques est certainement au plus haut point chez les adhérents des "fruitières" du Jura.

Après une période, concomitante de l'apparition des antibiotiques en thérapeutique vétérinaire et pendant laquelle des accidents furent notés, ces accidents sont de moins en moins fréquents, et rares depuis deux à trois ans. Ce progrès est le fait d'une information répandue par les contrôleurs laitiers et par les praticiens vétérinaires. Il nous fut confirmé que le lait de vaches traitées est écarté de la fabrication pendant les quatre à cinq jours suivant un traitement, dans certains cas pendant neuf à douze jours ! Cette discipline tient à la forme coopérative, propre à cette région, qui oblige dans sa marche pratique, un contact étroit et permanent des producteurs et du fromager.

Coopérative qui d'une part oblige le fromager à surveiller de très près la qualité du lait qu'on lui apporte s'il ne veut pas risquer de perdre sa fonction à force d'accidents de fabrication. Coopérative qui, d'autre part, oblige chaque producteur à se surveiller lui-même, si ce n'est ses voisins, puisqu'en définitive, celui qui serait tenté de fournir du lait propre à empêcher la fabrication d'un fromage, se verrait soustrait aux bénéfices de la vente de ce fromage, comme les autres fournisseurs.

Sur le territoire de Charente-Maritime, malgré un quadrillage par de nombreuses coopératives laitières, ce qui pourrait inciter à penser que les problèmes de celles-ci intéressent directement les fournisseurs, il semble que les producteurs n'aient pas pris conscience du problème. Il nous fut confirmé par les vétérinaires praticiens de

cette région que le problème causé aux fromagers par les antibiotiques et, encore bien plus, l'étiologie de la présence des antibiotiques dans le lait échappe à l'intérêt du fournisseur. Celui-ci est incapable, dans l'ignorance même des faits, d'écarter, comme il lui est recommandé, un lait apparemment sain, mais qui contient cependant de la pénicilline, ainsi que le test de diffusion en gelose le prouve.

A l'opposé de la forme coopérative se situent les laiteries industrielles où il semble évident, si même le contact est étroit entre laitier et producteur, que celui-ci ne veut prendre part aux ennuis de l'industriel laitier. Le producteur préfère livrer un lait dangereux plutôt que de se dessaisir du bénéfice de quelques litres de lait. Cette situation était le cas en Bretagne et, à notre surprise, nous n'avons trouvé aucun lait contaminé, mais dans cette région de France, c'est sans doute dans d'autres motifs qu'il faut en chercher la raison.

5° FREQUENCE ET IMPORTANCE DE L'ANTIBIOTHERAPIE DES MAMMITES.

L'antibiothérapie des mammites, si elle était moins fréquente, ou moins importante, en France, que dans les pays anglo-saxons, pourrait expliquer les différences que notre enquête a montrées.

WELCH (75) a estimé qu'il était employé 75 tonnes d'antibiotiques par an aux U.S.A. pour la thérapeutique des mammites. ALBRIGHT (1) rapporte qu'une firme pharmaceutique américaine a évalué, en 1957, qu'au moins 80 % de son chiffre d'affaires était constitué par la vente directe aux producteurs. En Angleterre, depuis peu, la vente directe aux producteurs est interdite, devant l'emploi abusif des antibiotiques par ceux-ci.

Nous ne possédons pas de données générales équivalentes en ce qui concerne la France.

Les praticiens que nous avons vu font systématiquement appel aux antibiotiques pour traiter les mammites.

En Charente-Maritime, les praticiens utilisent de fortes doses dans leur thérapeutique et, selon eux, il est fait grand usage de crayons vendus en dehors de leur contrôle.

En Bretagne, il nous fut impossible de nous faire une idée précise sur ce sujet ; on nous a laissé entendre que l'usage des antibiotiques était souvent méconnu.

Dans le Jura, les producteurs que nous avons rencontrés n'ignorent jamais l'usage personnel des tubes et des crayons.

Si, dans le Jura, depuis ces dernières années, les accidents de fabrication en laiterie ont diminué, cela ne peut venir d'une diminution de l'antibiothérapie dont le succès est toujours assuré du fait de son efficacité.

A la question : « La vente en dehors de votre contrôle vous semble-t-elle plus importante ou moins », douze vétérinaires, à qui nous nous sommes adressés, ont répondu, un : beaucoup plus, trois : plus, trois : égal, quatre : moins, un : nul.

Nous nous sommes, d'autre part, adressé à un industriel laitier qui, dans une certaine mesure, pouvait répondre à notre volonté d'estimer l'importance de l'usage des antibiotiques. Il existe, en France, quelques laiteries qui, par un système de marques spéciales, demandent à leurs fournisseurs de leur indiquer un lait contaminé par les antibiotiques. Les laitiers, de leur côté, achètent ce lait aux prix normal. M. L... nous a aimablement communiqué la proportion de lait écarté de la fabrication fromagère dans son usine de Normandie. Dès le début d'un traitement, le producteur est tenu de le déclarer, le laitier retire alors de la fabrication le lait de celui-ci pendant dix jours, estimant que le traitement lui-même dure cinq jours.

Sur une année entière, soit sur plusieurs millions de litres, c'est 1 % du lait qui est ainsi écarté.

Il est très difficile d'estimer la fréquence et l'importance de l'antibiothérapie des mammites en France, et encore moins de faire des comparaisons avec les pays étrangers.

L'emploi des antibiotiques par les praticiens est systématique pour traiter les mammites, mais la fréquence de leurs interventions diffère d'une région à l'autre.

L'utilisation d'antibiotiques par les producteurs, en dehors du contrôle vétérinaire est difficilement chiffrable. Quoi qu'il en soit, elle ne peut constituer une source importante d'antibiotiques dans le lait, car les titres de produit actif, dans ces préparations, sont faibles.

6° NATURE DE LA THERAPEUTIQUE CONTRE LES MAMMITES

A l'exemple des enquêtes anglo-saxonnes citées au début de ce chapitre, nous n'avons pu déceler, dans le lait, que la seule pénicilline.

Il nous a paru intéressant de connaître la fréquence d'emploi de pénicilline dans la thérapeutique vétérinaire des mammites, en France et à l'étranger.

On sait qu'aux Etats-Unis l'emploi de la pénicilline est primordial : en Grande-Bretagne, c'est 85 à 90 % des mammites qui sont traitées par cet antibiotique.

L'hypothèse d'une différence dans la fréquence d'emploi de la pénicilline a motivé un questionnaire que nous avons envoyé à seize praticiens vétérinaires français. Des treize réponses que nous avons reçues, il ressort que :

1° Le traitement, institué par le vétérinaire lui-même, est constitué :

- Pour 50 % par de la terramycine et de l'auréomycine, et pour 50 % par de la pénicilline, de la streptomycine et du chloramphénicol, sous les deux associations « Peni-Strepto » ou « Peni-Strepto-Chloramphénicol » ;

2° Lorsque les éleveurs traitent eux-mêmes, ils demandent au vétérinaire ou il leur est recommandé par celui-ci :

- Pénicilline, streptomycine ou chloramphenicol dans 60 % des cas et terramycine ou auréomycine dans 40 % des cas.

A la lumière de ces renseignements, l'emploi de la pénicilline, pour le traitement des mammites, dépasse de peu 50 % et il semblerait que cet antibiotique soit un peu moins utilisé en France que dans les pays anglo-saxons.

Le pourcentage de 50 % peut être rapproché du chiffre de 1 % de lait contaminé par tous les antibiotiques, tel qu'il nous a été fourni par M. L... et du chiffre de 0,40 % que nous avons trouvé comme étant la proportion de lait contenant la seule pénicilline.

Si ces chiffres semblent corroborer, ils ne doivent, cependant, pas avoir valeur de démonstration, car ils ont été établis sur des régions différentes.

7° CONCLUSION DE LA DISCUSSION DES RESULTATS

Nous avons été amené à avancer diverses hypothèses pour expliquer le faible pourcentage de lait contaminé que nous avons décelé, en regard des résultats étrangers. Ces hypothèses n'ont pu être totalement vérifiées, souvent faute de renseignements précis concernant les enquêtes étrangères.

Les résultats des enquêtes étrangères sont homogènes, bien que réalisés dans des régions diverses.

Les résultats obtenus dans les trois zones françaises de production ne sont pas homogènes entre eux ; ils ne peuvent être le reflet de la fréquence des antibiotiques dans le lait, en France,

mais seulement le reflet dans le trois zones de production considérées.

Les essais d'explication nous ont permis de dégager la physiologie des trois régions sur lesquelles ont porté notre enquête.

Elles nous ont montré que la fréquence des antibiotiques dans le lait était liée, à côté de facteurs propres au mode de traitement, au comportement original d'hommes profondément attachés aux mœurs de terres très différentes.

CONCLUSIONS

L'antibiothérapie intramammaire crée, pour la consommation humaine et en technologie laitière, le problème des répercussions des antibiotiques présents dans le lait de la vache traitée.

1° La prise de conscience de ce problème, ainsi que les textes légaux interdisent à l'éleveur de livrer du lait contaminé par les antibiotiques.

2° Notre enquête consistait à déterminer la fréquence des laits contaminés, livrés à l'industrie laitière.

Il nous fallait utiliser une méthode de détection simple, sensible et fidèle : nous avons choisi une méthode de diffusion en gélose dont l'organisme-test est la souche de *Bacillus Subtilis* ATCC 6633.

3° En regard des résultats étrangers, les nôtres sont caractérisés par le faible pourcentage des laits contaminés : sur 2.713 échantillons analysés représentant le lait de 1.203 producteurs, 0,40 % est contaminé, soit 1,76 % des producteurs. Nos résultats sont discutés en tenant compte des réalités propres aux trois zones de production où a été menée l'enquête.

Ces résultats sont ceux de 1962, ils ne peuvent faire présumer de l'avenir car l'intervention des antibiotiques dans la thérapeutique des mammites ne cesse d'évoluer.

Vu :

Le Directeur
de l'Ecole Vétérinaire de Lyon
FLORIO

Le Professeur
de l'Ecole Vétérinaire
BERTRAND

Le Doyen
de la Faculté de Médecine de Lyon
HERMANN

Le Président de la Thèse
BERTOYE

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
M. PIERRE LOUIS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALBRIGHT (J.L.), TUCKEY (S.L.) et WOODS (G.T.). — Antibiotics in milk. A review. *J. Dairy Sci.*, 1961, **44**, 779-807.
2. ALBRIGHT (J.L.), ORMISTON (E.E.), BRODIE (L.D.) et WITTER (L.D.). — Penicillin in milk following intramuscular and intramammary administration of penicillin in normal and mastitic cows. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 1961, **138**, 70-71.
3. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. — *Standard methods for the examination of dairy products*, 10 th Ed. New York, New York, 1953.
4. ARRET (B.) et KIRSHBAUM (A.). — A rapid disc assay method for detecting penicillin in milk. *J. Milk Food Techn.*, 1959, **22**, 329-331.
5. — Addendum. *J. Milk Food Techn.*, 1960, **23**, 32.
6. AUCLAIR (J.E.). — The inhibition of micro-organisms by raw milk. III. Distribution and properties of two inhibitory substances, lactenin 1 and lactenin 2. *J. Dairy Res.*, 1954, **21** 323-336.
7. AUCLAIR (J.E.) et BERRIDGE (N.J.). — The inhibition of micro-organisms by raw milk. II. The separation and electrophoretic examination of two different inhibitory fractions. *J. Dairy Res.*, 1953, **20**, 370-374.
8. AUCLAIR (J.E.) et KIRSCH (A.). — The inhibition of micro-organisms by raw milk. I. The occurrence of inhibitory and stimulatory phenomena. Methods of estimation. *J. Dairy Res.*, 1953, **20**, 49-50.
9. AUCLAIR (J.E.) et PORTMANN (A.). — Influence du chauffage du lait aux températures de pasteurisation et de stérilisation sur la croissance des bactéries lactiques. *Comptes rendus, XIV^e Congrès International sur le lait et ses dérivés*, 1956, **1. 2.** 17-27.
10. BERRIDGE (N.J.). — Testing for penicillin in milk. *Dairy Industr.*, 1953, **18**, 586.
11. BERRIDGE (N.J.). — Penicillin in milk. I. The rapid routine assay of low concentrations of penicillin in milk. *J. Dairy Res.*, 1956, **23**, 336-341.
12. BERRIDGE (N.J.). — Penicillin in milk. II. The incidence of penicillin. *J. Dairy Res.*, 1956, **23**, 342-347.

13. BERTRAND (M.). — Cours magistral de pathologie de la reproduction. Années scolaires 1959-1960 et 1960-1961. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.
14. BORRIE (P.F.). — Antibiotics in milk. Medical aspects. *J. Soc. Dairy Technol.*, 1962, **15**, 15-17.
15. BORRIE (P.F.) et BARRETT. — Dermatitis caused by penicillin in bulked milk supplies. *J. Brit. med.*, **5262**, 1961, 1267.
16. BRADFIELD (A.), RESI (L.A.) et JOHNSTONE (D.B.). — The presence of aureomycin in milk and its effects on cheese making and starter activity. *J. Dairy Sci.*, 1952, **35**, 51-58.
17. CERNY (J.) et MORRIS (R.L.). — A modified disc assay method for detecting antibiotics in milk. *J. Milk Food Techn.*, 1955, **18**, 281-283.
18. COLLINS (E.B.). — A simple method for detecting inhibitory substances in milk. *Milk Prod. J.*, 1957, **3**, 48-50.
19. COLLINS (E.B.). — Antibiotics in milk. *Paper presented at the Animal Husbandry Livestock Day. Davis, California* Feb. 1, 1958.
20. CRIEP (L.H.), ARBESMAN (C.E.), SHELDON (J.M.), SIEGEL (B.B.) et WEINSTEIN (H.I.). — The present status and problems involved in human sensitization to antibiotics. Panel discussion. *Antibiot. Annual*, 1959-1960, 979-1000. Medical Encyclopedia Inc., New York, 1960.
21. CHURCHILL (E.S.) et FRANK (C.L.). — The estimation of antibiotic levels in milk by the paper disk method. *Michigan Branch Society of American Bacteriologists, Detroit, Michigan*, Apr. 7, 1951.
22. DAUER (C.C.) et DAVIES (D.J.). — Summary of disease outbreaks. *J. Milk Food Techn.*, 1959, **22**, 335-337.
23. DOPTER (P.). — La recherche d'antibiotiques seuls ou associés dans le lait. *C.R. Acad. Agric.*, 1956, **42**, 519-522.
24. DOPTER (P.). — Essais de dosage d'antibiotiques dans le lait. *Le lait*, 1960, **393-394**, 1-8.
25. GERWE (E.G.). — Problems encountered in the manufacture of commercial sensitivity discs. *Antimicrobial Agents annu.*, 1960, 465-468.
26. GOGAS (W.) et BICKNELL (A.K.). — The determination of penicillin in milk. *Milk Plant Month.*, 1953, **42**, 26-28.
27. GROVE (D.C.) et RANDALL (W.A.). — *Antibiotics monographs n° 2. Assay methods of antibiotics*, 1^{re} éd., 12-14. Medical encyclopedia Inc., New York, 1955.
28. HARGROVE (R.E.), WALTER (H.E.), MALKAMES (J.P.) et MASKELL (K.J.). — The effect of penicillin and streptomycin on swiss cheese starters. *J. Dairy Sci.*, 1950, **33**, 401.
29. HARGROVE (R.E.), PLOWMAN (R.D.) et WRIGHT (W.W.). — Symposium use of markers in veterinary preparations for the detection of antibiotics in milk. *J. Dairy Sci.*, 1959, **42**, 202-206.
30. HERMIER (J.). — L'activation par la chaleur de la germination des spores de « *Bacillus subtilis* ». *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1958, **246**, 3298-3300.

31. HERMIER (J.). — L'influence d'un préchauffage en présence de glucides sur la germination des spores de « *Bacillus subtilis* ». *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 1958, **246**, 3388-89.
32. HIBBS (R.A.) et BOYD (J.C.). — Some observations on testing milk samples for antibiotics. *J. Milk Food Techn.*, 1957, **20**, 109-112.
33. HOGH (P.) et RASMUSSEN (F.). — Tracer dye green S in penicillin preparation for intramammary application. *Acta vet. Scand.*, 1961, **2**, 185-187. Cité dans *Dairy Sci. Abstr.*, 1961, **23**, 554.
34. HORALL (B.E.) et ELLIKER (P.R.). — An activity test for cheddar and cottage cheese starters. *J. Dairy Sci.*, 1950, **33**, 245-249.
35. HOVMAND (H.C.), JEPSEN (A.) et OVERBY (A.J.). — Two years of collective mastitis campaign in cooperative dairies with practical control of penicillin. Induced starter failures by use of penicillinase or penicillin resistant starter. *Nord. Vet. Med.*, 1954, **6**, 591.
36. JACQUET (J.), DELACROIX (J.) et GONDOUIN (H.). — Etude sur les accidents provoqués en fromagerie du camembert par la présence de pénicilline dans le lait. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 1951, **37**, 189-195.
37. JACQUET (J.) et STEEG (L.). — Méthode microbiologique de diagnose et de titrage des antibiotiques dans le lait et les produits laitiers. *Ann. Falsif. Fraudes*, 1953, **46**, 5-14.
38. JAGO (G.R.). — Factors influencing the lactic acid-producing properties of streptococci used in the manufacture of cheddar-cheese. *J. Dairy Res.*, 1954, **21**, 111-121.
39. JESTER (W.R.), WRIGHT (W.W.) et WELCH (H.). — Antibiotics in fluid milk. Fourth nationwide survey. *Antibiot. and chemother. Washington*, 1959, **9** 393-397.
40. JOHNS (C.K.). — Comments on a new test for penicillin in milk. *J. Milk Food Techn.*, 1960, **23**, 6-7.
41. JOHNS (C.K.). — Further observations on testing milk for penicillin. *J. Milk Food Techn.*, 1960, **23**, 266-268.
42. JOHNS (C.K.) et BERZINS (I.). — Observations on the determination of antibiotics in milk. *J. Milk Food Techn.*, 1956, **19**, 14-17.
43. JONES (F.S.) et SIMMS (H.S.). — The bacterial growth inhibitor (Lactenin) of milk, *J. exp. Med.*, 1930, **51**, 327.
44. KATZNELSON (H.) et HOOD (E.G.). — Influence of penicillin and other antibiotics on lactic streptococci in starter cultures used in cheddar cheese making. *J. Dairy Sci.*, 1949, **32**, 961-968.
45. KAUTZ (H.D.). — Penicillin and other antibiotics in milk. *J. Milk Food Techn.*, 1959, **22**, 344-45.
46. KEOGH (B.P.). — A simple test for the detection of penicillin. *Aus. J. Dairy Technol.*, 1961, **16**, 19-21.
47. KOSIKOWSKI (F.V.). — Controlling growth of test bacteria for antibiotic assays through anaerobiosis. *Science*, 1957, **126**, 844-845.

48. KOSIKOWSKI (F.V.). -- Field test kits for penicillin in milk *Amer. Milk Rev.*, 1960, **22**, 38-39.
49. KOSIKOWSKI (F.V.). The control of antibiotics in milk through a sound test program. *J. Milk food Technol.*, 1960, **23**, 285-287.
50. KOSIKOWSKI (F.V.). -- Communication personnelle, 1962.
51. KOSIKOWSKI (F.V.), — HENNINGSON (R.W.) et SILVERMAN (G.J.). The incidence of antibiotics, sulfa drugs and quaternary ammonium compounds in the fluid milk supply of New York state. *J. Dairy Sci.*, 1952, **35**, 533-539.
52. KOSIKOWSKI (F.V.) et MOCQUOT (G.). A technique to increase sensitivity of the disc assay method for antibiotics in milk. *Comptes rendus, XIV^e Congrès International du lait et de ses dérivés*, 1956, **3**, **2**, 203-211.
53. KOSIKOWSKI (F.V.) et MOCQUOT (G.). -- Progrès de la technologie du fromage. *Etudes agricoles de la F.A.O.*, 1958, **38**, 50-65, 205-211.
54. KOSIKOWSKI (F.V.) et LEDFORD (R.A.). — A reverse phase disk assay. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 1960, **136**, 297-299.
55. KOSIKOWSKI (F.V.) et LEDFORD (R.A.). — Problems of design in simple field tests for antibiotics in milk. *J. Dairy Sci.*, 1960, **43**, 842.
56. LEDFORD (R.A.) et KOSIKOWSKI (F.V.). Anaerobic studies with antibiotic sensitive bacteria. *J. Dairy Sci.*, 1960, **43**, 851.
57. LEMOIGNE (M.), SANCHEZ (G.) et GIRARD (H.). Caractérisation de la pénicilline et de la streptomycine dans le lait. *C.R. Acad. Agricult. Fr.*, 1952, **39**, 608.
58. LEVOWITZ. Tests kits for penicillin. *Amer. Milk Rev.*, 1950, **22**, 17-18.
59. LISKA (B.J.). A direct microscopic method for detecting antibiotic activity in milk. *J. Milk Food Techn.*, 1960, **23**, 117-121.
60. MARTH (E.H.) et ELLICKSON (B.E.). Antibiotic residues in milk and milk products. A review. *J. Milk Food Techn.*, 1959, **22**, 241-249.
61. MOCQUOT (G.), CHEVALIER (R.), BARNIER (R.), ALCCLAIR (J.E.) et ALAIS (C.). Etude sur le dépistage des mammites et leur traitement par la pénicilline dans la région du Gruyère. *C.R. Acad. Agricult. Fr.*, 1949, **35**, 30-35.
62. OVERBY (A.J.). -- The effect of various antibiotics in milk following intramammary infusion. *Nord. Vet. Med.*, 1952, **4**, 993-1004.
63. OVERBY (A.J.). -- Antibiotics in milk. A review. *Dairy Sci. abstr.*, 1954, **16**, 2-23.
64. PANES (J.J.), EDGE (M.), HOBSON (M.) et THOMAS (S.B.). — The incidence of penicillin in milk supplies. *J. Soc. Dairy Technol.*, 1957, **10**, 81-83.
65. Penicillin concentration disks. *Difco laboratories circular*, Detroit, Michigan, 1950.
66. PIEN (J.), LIGNAC (J.) et CLAUDE (P.). Détection biologique des antiseptiques et des antibiotiques dans le lait. *Le lait*, 1953, **33**, 369-382.
67. PLOMMET (M.). Communication personnelle, 1962.

68. RUSOFF (L.L.), LEE (G.C.) et STONE (E.J.). — Studies of chlortetracycline distribution in milk. *Abstract-Presented at Southern division, A.D.S.A. Birmingham Ala*, Feb, 4-6, 1957.
69. SIINO (F.A.), CZARNECKI (R.B.) et HARRIS (W.K.). — The incidence of penicillin in the market milk supply of a local New-England area. *J. Milk Food Techn.*, 1958, **21**, 211-214.
70. SILVERMAN (G.J.) et KOSIKOWSKI (F.V.). — Systematic testing of inhibitory substances in milk. *J. Milk Food Techn.*, 1952, **15**, 120-124.
71. SMITASIRI (T.), KOSIKOWSKI (F.V.), GUTHRIE (R.S.) et FINCHER (M.G.). Dyes as markers for antibiotic contaminated milks. *J. Milk Food techn.*, 1958, **21**, 255-258.
72. STORRS (F.C.) et HOETT-BROWN (W.). — The incidence of penicillin in milk supplies. *J. Dairy Res.*, 1954, **21**, 337-341.
73. UVAROV (O.). — The concentration of some antibiotics in the milk after intramammary infusion. *Vet. Rec.*, 1960, **72**, 1228-1231.
74. VINCENT (J.G.) et VINCENT (H.W.). — Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1944, **55**, 162.
75. WAISBREN (B.A.) et STRELITZER (C.L.). — Antibiotic sensitivities of staphylococci isolated before and after patients were given antibiotics. *Amer. J. Med. Sci.*, 1959, **238**, 202.
76. WELCH (H.). — Problems of antibiotics in food as the food and drug administration sees them. *Amer. J. Public. Health*, 1957, **47**, 701-705.
77. WELCH (H.), JESTER (W.R.) et BURTON (J.M.). — Antibiotics in fluid market milk. *Antibiot. and Chemother (Washington)*, 1956, **6**, 369-374.
78. WHITEHEAD (H.R.) et COX (G.A.). — The detection of penicillin in milk. *J. appl. Bact.*, 1956, **19**, 247-249.
79. WILSON (C.D.). Antibiotics in milk. Veterinary aspects. *J. Soc. Dairy Techn.*, 1962, **15** 21-27.
80. WITTER (L.D.) et TUCKEY (S.L.). — Variable factors in the new test for penicillin in milk. *J. Milk Food Techn.*, 1960, **23**, 230-233.
81. WOLIN (A.G.) et KOSIKOWSKI (F.V.). — Some characteristics of the natural antibacterial properties of milk. *J. Dairy Sci.*, 1955, **38**, 597.
82. WOLIN (A.G.) et KOSIKOWSKI (F.V.). — Formation of bacterial inhibitory zones in whey agar by raw milk. *J. Dairy Sci.*, 1958, **41**, 34-40.
83. ZIMMERMAN (M.C.). — Chronic penicillin urticaria from dairy products. proved by penicillinase cures. *Arch. Dermatol.*, 1959, **79**, 1.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
Généralités	11

PREMIÈRE PARTIE

Les problèmes suscités par la présence d'antibiotiques dans le lait	13
a) Problèmes de santé publique	13
1° Sensibilisation de l'homme aux antibiotiques	13
2° Acquisition, par des souches microbiennes, d'une résistance à l'action des antibiotiques.....	15
b) Problèmes d'industrie laitière	16
1° Inhibition des levains lactiques	16
2° Accidents de fabrication dans l'industrie laitière ..	17
c) Quantités d'antibiotiques dans le lait après traitement	18

DEUXIÈME PARTIE

Les méthodes de détection des antibiotiques dans le lait....	23
a) Tests fondés sur les modifications de morphologie des levains lactiques	24
b) Tests fondés sur les modifications de métabolisme de micro-organismes mis en présence d'antibiotiques..	24
c) Tests fondés sur la diffusion en gélose des antibiotiques	27
— Principe de la méthode	28

— Les éléments du test	29
— Interprétation des zones d'inhibition.....	37

TROISIÈME PARTIE

L'enquête	41
<i>a)</i> La méthode employée	41
<i>b)</i> Les résultats	45
<i>c)</i> Discussion des résultats	49

CONCLUSION	57
------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	59
---------------------	----

